

双环醇对2型糖尿病KKAy小鼠治疗作用的实验研究

王亚男, 张晓琳, 尹震, 田金英, 李雪晨, 叶菲*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究旨在探讨化合物双环醇 (bicyclol, By) 对2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) KKAy小鼠的治疗作用及其作用机制。实验采用雌性KKAy小鼠, 灌胃给予双环醇 (100、200、400 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。阳性对照药为二甲双胍 (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。以空腹血糖水平、非禁食血糖水平、葡萄糖耐量等指标评价药物的控制血糖作用; 以空腹血胰岛素水平、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 评价机体的胰岛素敏感性; 以胰岛素刺激后胰岛素信号通路的激活评价肝组织对胰岛素的反应性; 以蛋白质印记的方法检测肝组织的蛋白表达。动物实验过程遵循中国医学科学院动物伦理委员会的规定。结果显示, KKAy小鼠具有高血糖、胰岛素抵抗等典型的T2DM病理特征。给予双环醇治疗后, KKAy小鼠空腹血糖水平明显降低, 并呈一定的剂量依赖性和时间依赖性。同时, 其空腹血胰岛素水平、胰岛素抵抗指数均明显降低; 肝组织的胰岛素诱导的胰岛素信号通路的磷酸化水平明显上调, 使p-IRβ/IRβ、p-Akt/Akt比值明显升高; 糖异生关键蛋白FoxO1的磷酸化水平显著升高。推测双环醇可能通过改善KKAy小鼠全身和肝脏的胰岛素抵抗, 抑制肝组织糖异生, 从而发挥控制血糖的作用。未发现明显的双环醇对二甲双胍的降血糖作用的影响。

关键词: 双环醇; 2型糖尿病; KKAy小鼠; 胰岛素抵抗

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1041-07

Experimental study of bicyclol for type 2 diabetic treatment using KKAy mice

WANG Ya-nan, ZHANG Xiao-lin, YIN Zhen, TIAN Jin-ying, LI Xue-chen, YE Fei*

(Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To investigate the effects of small molecule compound bicyclol on type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its mechanism of action, KKAy mice were treated with various doses of bicyclol (100, 200, and 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹) with metformin (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹) as a positive control, respectively. Age-matched C57BL/6J mice were used as the non-diabetic control (Con). The effect on hyperglycemia was evaluated by the levels of no-fasting blood glucose, fasting blood glucose (FPG), and glucose tolerance. Whole body insulin sensitivity was evaluated by fasting plasma insulin (FPI) and homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR). The hepatic response to insulin was evaluated by insulin-induced activation of insulin signaling pathway. Western blot was performed to detect hepatic protein expressions. All animal experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Chinese Academy of Medical Sciences. KKAy mice showed T2DM characteristics such as hyperglycemia and insulin resistance, including attenuated response to insulin in the liver. A 28-day treatment of bicyclol suppressed both FPG and no-fasting blood glucose, in a dose- and time-dependent manner. Moreover, FPI and HOMA-IR values were both significantly decreased, and hepatic insulin-induced-phosphoryla-

收稿日期: 2019-01-25; 修回日期: 2019-03-26.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09103-101-063, 2018ZX09711001-003-005); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81600546, 81703665); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程团队项目 (CIFMS-2016-I2M-3-012).

*通讯作者 Tel: 86-10-83150495, E-mail: yefei@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0086

tion of IR β and Akt were up-regulated in KKAY mice after bicyclol treatment. Phosphorylation of FoxO1, the key transcription factor for regulating gluconeogenesis, was also significantly elevated by bicyclol treatment. These results suggested that bicyclol has some therapeutic effects on hyperglycemia in a time- and dose-dependent manner in KKAY mice. Its mechanism might be attributed to improving insulin resistance, enhancing hepatic insulin signaling pathway, and inhibiting gluconeogenesis. No significant interference on the hypoglycemic effect of metformin by bicyclol was observed in this study.

Key words: bicyclol; type 2 diabetes; KKAY; insulin resistance

糖尿病是指由于胰岛素分泌和(或)胰岛素作用的缺陷导致的高血糖为主要特征的一组代谢性疾病。近年来随着膳食结构及生活方式的转变,糖尿病在全世界广泛流行,已成为继肿瘤、心血管疾病之后第三位严重危害人类健康的慢性代谢病。糖尿病并发症包括酮症酸中毒、高血糖高渗状态等急性并发症以及糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变等慢性并发症,严重影响人们的生存和生活质量,为社会带来重大经济负担^[1]。糖尿病分为4类,分别为1型糖尿病、2型糖尿病(T2DM)、特殊类型糖尿病和妊娠期糖尿病,其中2型糖尿病为主要类型,整体占比90%~95%^[2]。随着城镇化、老龄化、超重肥胖患病率的增加,我国成人糖尿病患病率显著增加,2013年2型糖尿病患病率为10.4%,男性高于女性(11.1%比9.6%),未诊断糖尿病比例达63%^[3],且发病率增长速度持续增加。因此,对2型糖尿病的预防、发现及治疗均需给予重视。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是T2DM的病理生理学基础^[4,5],胰岛素增敏剂是抗T2DM药物研发的重点之一,炎症学说是胰岛素抵抗的重要机制之一^[6-8]。目前对于2型糖尿病的治疗,主要包括改变生活方式、药物治疗及针对肥胖合并糖尿病人群的减重手术治疗,T2DM治疗药物主要包括口服降糖药、胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)激动剂及胰岛素。其中,口服降糖药种类繁多,主要包括二甲双胍、促胰岛素分泌剂、 α -糖苷酶抑制剂、DPP-4抑制剂、SGLT2抑制剂、胰岛素增敏剂^[3]。目前临床最常用的为盐酸二甲双胍^[9],许多国家和国际组织制定的糖尿病诊疗指南中均推荐二甲双胍作为T2DM患者控制血糖的一线用药和联合用药的基本用药^[10]。本研究以二甲双胍作为阳性药,二甲双胍对KKAY小鼠空腹血糖及血胰岛素水平均有明显降低作用,实验结果与文献^[11,12]报道一致。

双环醇是我所自主研发的治疗慢性肝炎的国家一类新药,具有抗肝炎病毒和抗肝细胞损伤的双重作用^[13],临床上主要用于治疗慢性肝炎所致的氨基转移酶升高。研究发现双环醇通过抑制NF- κ B的表达及

细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1b(IL-1b)的释放而发挥抗炎作用^[14]。目前对于双环醇在糖代谢方面的报道不多。鉴于炎症与胰岛素抵抗密切相关^[6],推测双环醇对胰岛素抵抗可能有一定的改善作用。临床上2型糖尿病患者往往合并非酒精性脂肪性肝炎等慢性肝炎^[1,3],双环醇是否可以用于这部分患者呢?本研究应用具有脂肪性肝病特征的、经典的2型糖尿病KKAY小鼠模型,以二甲双胍作为阳性对照药,探讨了双环醇抗T2DM的作用,以及双环醇对二甲双胍药效的影响,并初步探讨了双环醇控制血糖的作用机制,为扩大其临床应用范围提供一定的实验依据。

材料与方法

药物和试剂 双环醇化学结构见图1,由北京协和药厂提供(批号:140406H,纯度>99%)。胰岛素受体(insulin receptor β , IR β)抗体、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)抗体、p-Akt抗体、叉头框蛋白O1(forkhead box transcription factor class O1, FoxO1)抗体、p-FoxO1抗体、actin抗体购自美国CST公司;p-IR β 抗体(Tyr1162/1163)购自美国Santa Cruz公司;胰岛素(鼠源)超敏ELISA试剂盒购自美国ALPCO公司;速效胰岛素购自江苏万邦生化医药股份有限公司;葡萄糖(分析纯)购自北京化学试剂公司;二甲双胍(metformin, Met)购自中美上海施贵宝公司。

动物 雌性12周龄自发性2型糖尿病KKAY小鼠[合格证号:SCXK(京)2009-0004]、C57BL/6J小鼠[合格证号:SCXK(京)2009-0004]以及高热量饲料(饲料

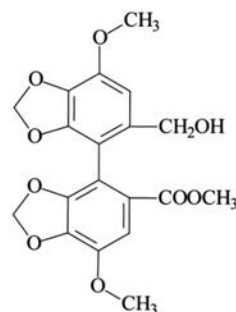


Figure 1 Chemical structure of bicyclol (C₁₉H₁₈O₉)

编号: 1K65) 均购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物饲养于中国医学科学院药物研究所实验动物中心(实验动物设施使用证明编号: 003729), 饲养温度23~25℃, 湿度40%~70%, 每天光照/黑暗时间为12 h/12 h。动物自由进食饮水, 实验过程符合《北京市实验动物管理条例》等实验动物道德伦理的相关规定(动物实验伦理审查表编号: 00000438)。

动物适应性饲养3天后, 选择随机血糖>220 mg·dL⁻¹的动物作为T2DM模型小鼠。将KKAy模型小鼠按照空腹血糖、非禁食血糖水平及体重随机分为5组($n=10$): Model、Met和By-L、By-M、By-H, 分别灌胃给予水、阳性对照药二甲双胍200 mg·kg⁻¹·d⁻¹和双环醇100、200、400 mg·kg⁻¹·d⁻¹。同周龄正常C57BL/6J小鼠为正常对照Con组($n=10$), 灌胃给予同体积水。动物连续给药, 每天1次。

将KKAy模型小鼠按照空腹血糖、非禁食血糖水平及体重随机分为3组($n=10$): Model、Met、Met+By, 分别灌胃给予水、阳性对照药二甲双胍200 mg·kg⁻¹·d⁻¹、二甲双胍200 mg·kg⁻¹·d⁻¹联合双环醇200 mg·kg⁻¹·d⁻¹。同周龄正常C57BL/6J小鼠为正常对照Con组($n=10$), 灌胃给予同体积水。动物连续给药, 每天1次。

血糖水平的评价

空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)测定 动物清晨禁食不禁水4 h后尾尖取血, 离心(3 500 r·min⁻¹, 4 min), 取上清液。采用葡萄糖氧化酶法^[15]测定血糖水平。

非禁食血糖(no-fasting plasma glucose)测定 动物清晨尾尖取血, 测定血糖水平(相当于随机血糖水平)。

口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT) 实验动物禁食4 h后, 灌胃给予葡萄糖2 g·kg⁻¹, 于葡萄糖负荷后0、30、60、120 min时尾尖取血, 检测血糖水平, 并计算血糖-时间曲线下面积(area under blood glucose-time curve, AUC)。

胰岛素敏感性评价

机体全身胰岛素敏感性 小鼠禁食4 h后, 尾尖

取血。按照ELISA试剂盒说明书的方法检测空腹胰岛素水平(fasting plasma insulin, FPI)。同时检测血糖水平, 并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR)值。计算公式如下:

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹血糖值} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{空腹胰岛素值} (\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}) / 22.5。$$

肝脏胰岛素敏感性 动物禁食过夜后, 腹腔注射戊巴比妥钠(100 mg·kg⁻¹)麻醉。每组分别随机取5只动物腹主动脉放血处死; 另5只动物于下腔静脉注射速效胰岛素(1 U·kg⁻¹)3 min后立即腹主动脉放血处死。尽快分离肝脏, 液氮速冻待用。应用蛋白质印记(Western blot)方法^[16], 检测肝组织内胰岛素信号通路蛋白的表达及其磷酸化水平。采用Tanon-5200(上海天能)凝胶成像系统采集图像, 用Tanon图像分析软件进行灰度分析。

统计学分析 所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 模型组与给药组间比较采用one-way ANOVA(GraphPad Prism 5.0), 正常对照组与模型组组间比较采用Student's *t*-test, $P < 0.05$ 被认为存在统计学差异。

结果

1 双环醇对KKAy小鼠血糖的调节作用

1.1 降低空腹血糖水平 2型糖尿病KKAy小鼠连续给药28天, 监测动物FPG, 结果显示(图2), 给药前(day 0)各组KKAy小鼠的空腹血糖水平基本一致, 且明显高于正常对照组。给予阳性药二甲双胍后第7、14、21、28天时其血糖水平分别比模型组降低35.3%、39.7%、56.4%、57.7%; 给予双环醇治疗后, 随着给药时间延长、给药剂量增大, FPG逐渐降低, 在给药第7、14、21、28天时, 与模型组相比, By-L组FPG未见明显变化; By-M组FPG分别降低0.7%、7%、6.8、27.5%; By-H组FPG分别降低0.6%、9.6%、23.5%、29.1%。提示双环醇具有一定的控制KKAy小鼠空腹血糖水平的作用, 呈剂量相关性和时间相关性, 随着给药剂量的增大和时

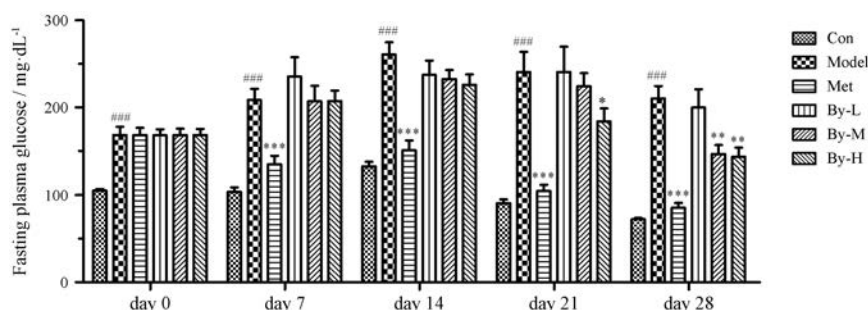


Figure 2 Effect of bicyclol on fasting plasma glucose in KKAy mice. Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-L: Bicyclol 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-M: Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-H: Bicyclol 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹. $n=10$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs Con; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Model

间的延长, 其对2型糖尿病KKAy小鼠的控制空腹血糖作用逐渐增强。

1.2 降低非禁食血糖水平 KKAy小鼠连续给药21天, 清晨固定时间尾尖取血, 监测动物非禁食血糖水平(相当于随机血糖水平), 结果显示(图3), 给药前(day 0)各组KKAy小鼠的非禁食血糖水平基本一致, 均明显高于正常对照组。给予双环醇治疗后, 随着给药时间延长、给药剂量增大, 动物的非禁食血糖水平逐渐降低, 在给药第7、21天时, 与模型组相比, By-L组分别降低了-4.1%、15.4%, By-M组分别降低了9.4%、13.7%, By-H组分别降低了15.6%、26.0%。提示双环醇具有一定的控制KKAy小鼠非禁食血糖的作用。

1.3 对葡萄糖耐量受损的影响 KKAy模型小鼠连续给药23天后, 禁食4h后取血测定0 min血糖水平(图4), Met、By-L、By-M、By-H组的血糖水平分别较模型组降低51.5%、8.6%、20.2%、8.6%。给予葡萄糖负荷后, 模型组动物葡萄糖负荷后各个点的血糖值较正常对照组明显升高, 其AUC值升高了102%, 表现出明显的糖耐量受损(impaired glucose tolerance, IGT)。与模型组相比, Met、By-L、By-M、By-H组的葡萄糖负荷后血糖峰值分别下降37.1%、8.2%、7.9%、13.9%, AUC水平分别下降33.8%、6.4%、3.9%、6.0%。提示二甲双胍

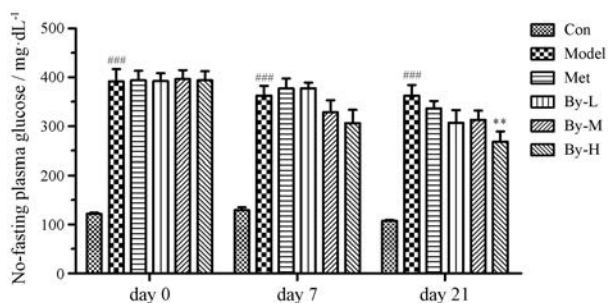


Figure 3 Effect of bicyclol on no-fasting plasma glucose in KKAy mice. Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-L: Bicyclol 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-M: Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-H: Bicyclol 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹. n = 10, $\bar{x} \pm s$. ###P<0.001 vs Con; **P<0.01 vs Model

具有明显改善KKAy小鼠葡萄糖耐量低减的作用; 而双环醇对KKAy小鼠葡萄糖耐量低减的作用不明显。

2 双环醇改善KKAy小鼠胰岛素抵抗的作用

2.1 改善机体整体胰岛素抵抗 分别以空腹血胰岛素(FPI)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)来评价动物的整体胰岛素敏感性。结果显示(图5), 模型组动物血胰岛素水平和HOMA-IR值均明显高于正常对照组。给药28天后, 与模型组比较, Met、By-L、By-M、By-H组血胰岛素水平分别降低了74.0%、21.0%、23.2%、25.7%; HOMA-IR值分别降低了89.0%、23.1%、44.9%、

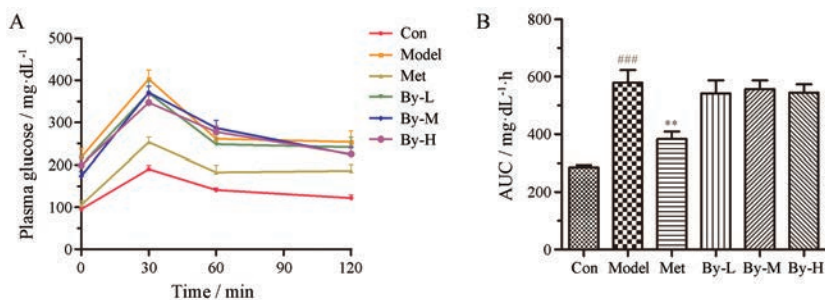


Figure 4 Effect of bicyclol on impaired glucose tolerance in KKAy mice. A: Changes of blood glucose levels after the glucose loading; B: Area under blood glucose-time curve (AUC) values in oral glucose tolerance test. Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-L: Bicyclol 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-M: Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-H: Bicyclol 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹. n = 10, $\bar{x} \pm s$. ###P<0.001 vs Con; **P<0.01 vs Model

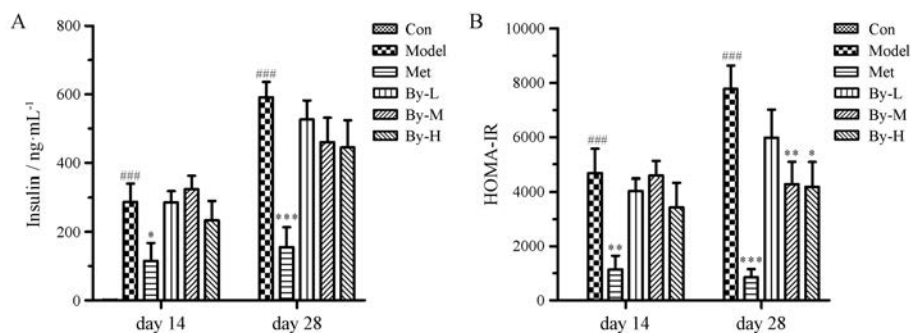


Figure 5 Effect of bicyclol on insulin resistance in KKAy mice. A: Fasting plasma insulin level; B: Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR). Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-L: Bicyclol 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-M: Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By-H: Bicyclol 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹. n = 10, $\bar{x} \pm s$. ###P<0.001 vs Con; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Model

46.1%。提示双环醇与二甲双胍类似,具有一定的改善动物全身胰岛素抵抗的作用。

2.2 增强肝脏组织胰岛素敏感性 连续给药28天,检测肝组织内胰岛素信号通路主要蛋白IR β 、Akt的表达及其磷酸化水平。结果显示(图6A~C),模型组肝组织p-IR β /IR β 比值及p-Akt/Akt比值较正常对照组分别降低了57.6%及27.3%,说明模型动物肝组织对胰岛素的反应性明显减低。与模型组相比,各给药组的IR β 和Akt蛋白表达水平无明显差异;Met组p-IR β /IR β 、p-Akt/Akt比值分别升高了184.4%、47.1%;By组分别上升了145.2%、51.4%。提示双环醇与二甲双胍类似,可显著上调肝脏胰岛素信号通路,改善模型小鼠肝组织对胰岛素的反应性。

2.3 下调肝组织糖异生作用 连续给药28天,于静脉注射胰岛素5 min后快速取肝脏,检测肝组织内调控糖异生的关键蛋白FoxO1的蛋白表达,以及胰岛素诱导的FoxO1磷酸化水平。结果显示(图6A、D),与模型组相比,Met组p-FoxO1/FoxO1比值升高了47.2%;By组上升了32.6%。提示与二甲双胍类似,双环醇可显著下调肝脏糖异生作用,改善模型小鼠肝脏的糖代谢。

3 双环醇不干扰二甲双胍的控制血糖作用

2型糖尿病KKAy小鼠连续给药28天,监测动物血糖水平,结果显示(图7A、B),给药前(day 0)各组KKAy小鼠的空腹血糖及非禁食血糖水平基本一致,且明显高于正常对照组。与模型组相比,Met组第7、28天时空腹血糖水平分别降低29.9%、40.1%,Met+By组分别降低23.3%、40.2%;Met组非禁食血糖水平分别降低18%、12.6%,Met+By组分别降低12.2%、22.2%。Met组与Met+By组的各个指标均未见明显差异,提示

双环醇对二甲双胍的控制KKAy小鼠血糖作用无明显干扰作用。

以FPI和HOMA-IR来评价动物的整体胰岛素敏感性。结果显示(图7C、D),模型组动物血糖胰岛素水平和HOMA-IR值均明显高于正常对照组。给药28天后,与模型组比较,Met、Met+By组血糖胰岛素水平分别降低了96.3%、92.8%;HOMA-IR值分别降低了97.9%、96%。Met组与Met+By组的各个指标均未见明显差异,提示双环醇对二甲双胍的胰岛素增敏作用亦未见明显干扰作用。

讨论

控制血糖水平是糖尿病治疗的根本。双环醇对糖尿病的治疗作用鲜见报道。研究显示,炎症与胰岛素抵抗密切相关^[6-8],而胰岛素抵抗是2型糖尿病的病理生理基础,提示抗肝炎药物双环醇可能通过改善机体胰岛素抵抗状态进而发挥治疗2型糖尿病的作用。KKAy小鼠是具有脂肪性肝病特征、经典的2型糖尿病动物模型。本研究通过观察双环醇对KKAy小鼠血糖的影响,探讨双环醇在治疗合并2型糖尿病的肝病的可能性。研究发现,双环醇可剂量依赖性和时间依赖性地降低2型糖尿病KKAy小鼠的空腹血糖水平(图2),但其起效时间明显晚于阳性对照药二甲双胍,其降低血糖的幅度亦明显低于同剂量的二甲双胍。经过较长时间(3~4周)较大剂量的双环醇的治疗后,KKAy小鼠的非禁食血糖水平亦有一定的降低趋势。双环醇对肥胖的KKAy小鼠的体重和摄食量未见明显影响(数据略)。此外,二甲双胍双环醇联用对二甲双胍单独作用的控制血糖的效果无明显干扰现象。上述实验

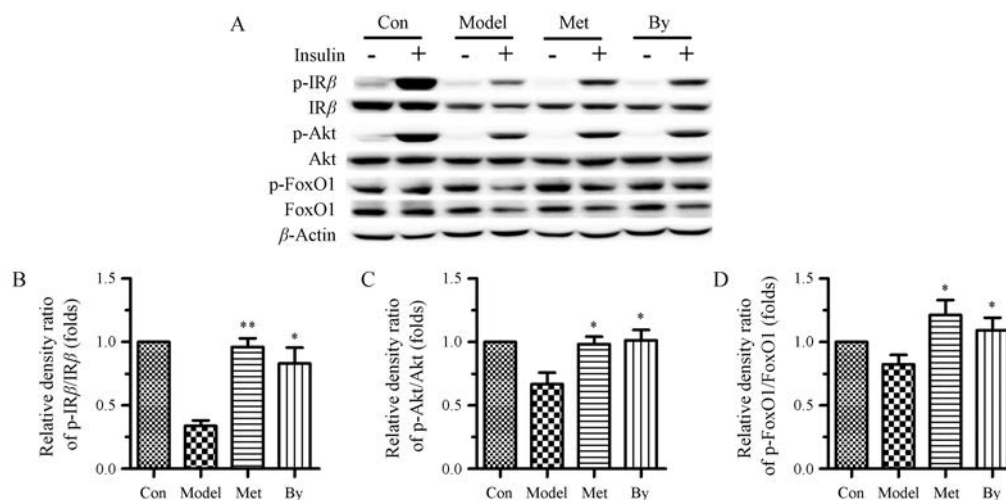


Figure 6 Effect of bicyclol on hepatic insulin pathway and downstream regulator of gluconeogenesis. A: Expressions of p-IR β , IR β , p-Akt, Akt in liver; B-D: Relative density ratio of p-IR β /IR β (B), p-Akt/Akt (C), and p-FoxO1/FoxO1 (D). Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; By: Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹. n = 3, $\bar{x} \pm s$. *P<0.05, **P<0.01 vs Model

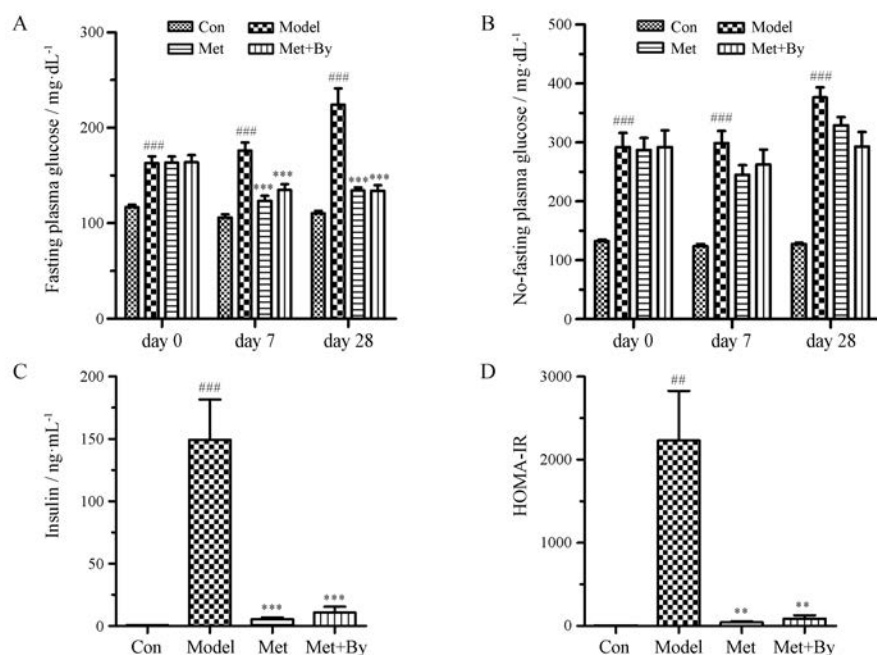


Figure 7 Comparison between combined administration of metformin+bicyclol and single administration of metformin. A: Fasting plasma glucose levels; B: No-fasting plasma glucose levels; C: Fasting plasma insulin levels; D: HOMA-IR value. Met: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹; Met+By: Metformin 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + Bicyclol 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹. *n* = 10. $\bar{x} \pm s$. ###*P*<0.01, ####*P*<0.001 vs Con; ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs Model

数据提示双环醇具有一定的抗2型糖尿病作用,但其控制血糖的药效强度明显低于二甲双胍,且不干扰二甲双胍的作用。

胰岛素抵抗被认为是T2DM发生发展的关键^[5]。胰岛素抵抗是指胰岛素靶组织(主要包括骨骼肌、肝脏和脂肪组织)对胰岛素敏感性或反应性降低,导致靶组织对葡萄糖的摄取和利用效率下降,或者胰岛素对糖异生的抑制作用减弱,引起血糖水平升高形成T2DM。同时,机体代偿性分泌过多的胰岛素从而形成高胰岛素血症,以维持血糖的稳定^[4,17]。本研究结果显示,KKAY小鼠发生明显的胰岛素抵抗,其FPI、HOMA-IR水平均高于正常对照组数十倍;阳性对照药二甲双胍可显著降低KKAY小鼠的FPI、HOMA-IR水平,具有明显的改善胰岛素抵抗的作用。上述结果与文献报道一致^[11]。经双环醇治疗后,模型动物的FPI、HOMA-IR值均明显降低,提示双环醇可通过增强机体全身胰岛素敏感性,从而起到控制血糖水平的作用。

维持机体血糖稳态的主要场所是肝脏、肌肉和脂肪组织。空腹血糖水平主要通过肝脏的糖异生和糖原分解调节,而餐后血糖水平的调节主要靠肌肉、脂肪的葡萄糖摄取及糖原合成实现。本研究发现双环醇主要调节2型糖尿病小鼠的空腹血糖水平,对动物的非禁食血糖的调节并不明显,因此,在小鼠OGTT实验中对葡萄糖负荷后的血糖调节作用较弱。

胰岛素在肝脏主要通过调节糖原合成,抑制糖异

生,从而控制血糖。一方面通过对糖原合酶-3β的磷酸化来激活糖原合酶(glycogen synthesis, GS),增加糖原合成从而调节随机血糖;另一方面促进FoxO1磷酸化抑制其活性,下调糖异生相关蛋白的表达,抑制糖异生,从而调节空腹血糖^[18]。而FoxO1与GSK3β都受胰岛素信号通路的调控^[19]。正常生理状态下,胰岛素与胰岛素受体(insulin receptor, IR)结合并引起其酪氨酸位点磷酸化,继而促进胰岛素受体底物(insulin receptor substrates, IRS)及肌醇磷脂3-激酶(phosphatidylinositol-3-OH kinase, PI3K)的磷酸化,激活Akt通路,进而促进FoxO1的磷酸化,抑制其入核,抑制糖异生^[20,21]。本研究以静脉注射胰岛素后动物肝脏胰岛素信号通路的激活水平评价肝脏的胰岛素的反应性。双环醇给药后模型动物IRβ、Akt的磷酸化水平显著升高(图6A~C),提示肝脏组织胰岛素信号通路明显增强。进一步研究显示,FoxO1的磷酸化水平明显上升(图6A、D),提示双环醇能够下调其糖异生作用,从而起到降低空腹血糖水平的作用,说明双环醇的主要降糖原理是改善2型糖尿病的胰岛素抵抗状态。此外,双环醇二甲双胍联合用药实验结果显示(图7),双环醇与二甲双胍的降糖作用和胰岛素增敏作用均未见明显的叠加现象。

总之,作为治疗肝炎的经典用药双环醇,可通过改善KKAY小鼠全身胰岛素抵抗、增加肝脏胰岛素反应性、抑制糖异生,从而发挥一定的控制血糖的作用。

双环醇治疗糖尿病的作用明显弱于二甲双胍; 未见明显干扰二甲双胍的控制血糖作用。本研究为双环醇应用于合并2型糖尿病的脂肪肝病的治疗提供了实验依据。

References

- [1] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2018 [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41: S1-S155.
- [2] Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, et al. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126: 406-410.
- [3] Chinese Diabetes Society. Chinese guideline for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus (2017 edition) [J]. *Chin J Diabetes Mellitus (中华糖尿病杂志)*, 2018, 10: 4-67.
- [4] Samuel VT, Shulman GI. Integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links [J]. *Cell*, 2012, 148: 852-871.
- [5] Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms [J]. *Acta Physiol*, 2011, 201: 297-312.
- [6] Zand H, Morshedzadeh N, Naghashian F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11: S307-S309.
- [7] Kim OK, Jun W, Lee J. Mechanism of ER stress and inflammation for hepatic insulin resistance in obesity [J]. *Ann Nutr Metab*, 2015, 67: 218-227.
- [8] Matulewicz N, Karczewska-Kupczewska M. Insulin resistance and chronic inflammation [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70: 1245-1258.
- [9] Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12: 566-592.
- [10] Mu YM, Ji LN, Ning G, et al. Chinese expert consensus statement on metformin in the clinical practice: 2016 updated [J]. *Chin J Diabetes (中国糖尿病杂志)*, 2016, 24: 871-884.
- [11] Wang YW, He SJ, Feng X, et al. Metformin: a review of its potential indications [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 2421-2429.
- [12] Thrasher J. Pharmacologic management of type 2 diabetes mellitus: available therapies [J]. *Am J Cardiol*, 2017, 120: S4-S16.
- [13] Tang T, Li Y. Protective effect of bicyclol against acute fatty liver induced by tetracycline in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 23-28.
- [14] Wu J, Zheng W, Rong L, et al. Bicyclol exerts an anti-tumor effect *via* ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in human renal cell carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1184-1192.
- [15] Tang RQ, Zhang XL, Tian JY, et al. The effects of compound CX09040 on the inhibition of PTP1B and protection of pancreatic β cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 682-689.
- [16] Zhou Y, Li XL, Yi Q, et al. Investigating the effects of compound WS090152 on non-alcoholic fatty liver in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 919-925.
- [17] Sah SP, Singh B, Choudhary S, et al. Animal models of insulin resistance: a review [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68: 1165-1177.
- [18] Han HS, Kang G, Kim JS, et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e218-e227.
- [19] Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28: 497-505.
- [20] Liu TY, Shi CX, Gao R, et al. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis *via* the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes [J]. *Clin Sci*, 2015, 129: 839-850.
- [21] Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism [J]. *Bone*, 2012, 50: 437-443.