

桑枝总生物碱与二甲双胍联合应用改善2型糖尿病KKAy小鼠糖代谢的作用及机制研究

陈蕾蕾^{1,2}, 雷丽冉^{1,2}, 曹慧^{1,2*}, 刘泉^{1,2}, 李彩娜^{1,2}, 雷蕾^{1,2}, 环奕^{1,2},
刘玉玲^{1,2,3}, 申竹芳^{1,2,4}, 刘率男^{1,2,4*}

- (1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;
2. 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050; 3. 药物传输技术与新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050;
4. 晶型药物研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本文考察了桑枝总生物碱(SZ-A)与临床一线用药二甲双胍(Met)联合应用对2型糖尿病KKAy小鼠糖代谢的影响并初步探讨其潜在机制。采用自发性2型糖尿病KKAy小鼠,根据其糖脂代谢相关指标分为模型对照组、桑枝总生物碱组(SZ-A, 100 mg·kg⁻¹)、二甲双胍组(Met, 100 mg·kg⁻¹)及SZ-A与Met联合给药组(100 mg·kg⁻¹ SZ-A + 100 mg·kg⁻¹ Met),每组10只,每天灌胃1次,连续7周,动态监测小鼠的摄食量、饮水量、体重和血糖等生化指标,并分别在给药2、5和6周后进行口服葡萄糖耐量、胰岛素耐量及丙酮酸钠耐量实验。实验经中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会的审查批准(批准号:00004332)。给药结束后组织取材,对肝脏进行称重、肝脏指数计算、脂质含量测定及病理分析,并采用Western blot检测KKAy小鼠肝脏、肌肉、脂肪组织中糖代谢及胰岛素信号通路相关因子的蛋白表达水平。结果表明,SZ-A和Met联合给药可明显降低KKAy小鼠的摄食量、饮水量、空腹血糖、随机血糖、糖化血红蛋白水平,还可显著改善小鼠的葡萄糖耐受性、增强胰岛素敏感性及抑制体内糖异生过程,且作用优于SZ-A或Met单药组。PI3K/PDK1/Akt/GLUT信号通路与胰岛素敏感性及葡萄糖摄取密切相关,与单药组相比,SZ-A和Met联合给药组KKAy小鼠肝脏、肌肉及脂肪组织中的PI3K/PDK1/Akt/GLUT信号通路相关因子显著上调。另外,SZ-A与Met联合给药也可改善肝脏脂质堆积,降低血转氨酶水平。综上,SZ-A和Met联合应用可激活外周组织胰岛素依赖的糖摄取通路,促进KKAy小鼠外周组织的糖摄取和利用,与单药组相比,联合给药对于随病程发展的血糖升高具有更好的控制作用。该研究可为糖尿病临床治疗药物的合理联用提供数据支持,为SZ-A的IV期临床再评价提供实验研究依据。

关键词: 桑枝总生物碱; 二甲双胍; 联合用药; 2型糖尿病; 胰岛素信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3619-09

Effects and mechanism of *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids combined with metformin on glucose metabolism in diabetic KKAy mice

CHEN Lei-lei^{1,2}, LEI Li-ran^{1,2}, CAO Hui^{1,2*}, LIU Quan^{1,2}, LI Cai-na^{1,2}, LEI Lei^{1,2}, HUAN Yi^{1,2},
LIU Yu-ling^{1,2,3}, SHEN Zhu-fang^{1,2,4}, LIU Shuai-nan^{1,2,4*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Beijing 100050, China; 4. Beijing Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Beijing 100050, China)

Abstract: To investigate the effects and mechanism of the combination of *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids

收稿日期: 2023-10-17; 修回日期: 2023-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973379); 中国医学科学院创新工程项目(2021-I2M-1-026, 2022-I2M-2-002); 北京市自然科学基金资助项目(7202137); 北京高校卓越青年科学家计划项目(BJJWZYJH01201910023028).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165194, E-mail: liusn@imm.ac.cn; caohui@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1174

(SZ-A) and metformin (Met) on glucose metabolism in type 2 diabetic mice, KKAY mice were divided into four groups according to the glucose and lipid indexes: control group (control), *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids group (SZ-A, 100 mg·kg⁻¹), metformin group (Met, 100 mg·kg⁻¹) and combined administration group (combination, Comb, 100 mg·kg⁻¹ SZ-A + 100 mg·kg⁻¹ Met). All groups were administered by gavage once daily for 7 weeks accompanied with monitoring food intake, water intake, body weight as well as glycemia. Additionally, oral glucose tolerance test (OGTT), insulin tolerance test (ITT) and oral sodium pyruvate tolerance test (OPTT) were performed at week 2, week 5, week 6, respectively. The experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (00004332). We determined the weight and lipid content of liver, and then performed the histopathological analysis after sacrificed. Furthermore, Western blot assay was used to detect the protein levels of key molecules of PI3K/PDK1/Akt/GLUT signaling pathway in liver, muscle and adipose tissue. Compared to the SZ-A or Met monotherapy group, SZ-A + Met significantly improved the glucose metabolism disorder, which was showed in reduced food intake, water intake, the level of fasting blood glucose, postprandial blood glucose and glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c) of KKAY mice, as well as improved glucose tolerance, enhanced insulin sensitivity and inhibited gluconeogenesis. In addition, SZ-A + Met obviously up-regulated the protein expression levels in PI3K/PDK1/Akt/GLUT signaling pathway in liver, muscle and adipose tissue of KKAY mice. Moreover, the liver lipid accumulation and blood aminotransferase level of KKAY mice in the combined administration group were significantly reduced. Therefore, we concluded that the combination of SZ-A and Met improved glucose metabolism and inhibited the occurrence and development of T2DM *via* promoting glucose uptake and utilization, suggesting that the combination of SZ-A and Met is a more useful treatment for T2DM.

Key words: *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids; metformin; combination; type 2 diabetes; insulin signaling pathway

2型糖尿病是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗而导致的慢性全身性代谢性疾病^[1,2],患者常表现出多饮、多食、高血糖的症状。近年来,2型糖尿病的患病形势仍然严峻,糖尿病的防治依然刻不容缓^[3]。目前,口服降糖药可分为双胍类、噻唑烷二酮类、磺脲类、格列奈类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、二肽基肽酶IV抑制剂(DPP-4i)、钠-葡萄糖共转运蛋白2抑制剂(SGLT-2i)7类^[4]。其中,按照临床指南推荐,二甲双胍(metformin, Met)是一线用药。临床上,由于患者病程延长及对相关不良反应的耐受性,单独服用二甲双胍常难以获得理想的降糖效果,因此,常常需要二甲双胍联合其他种类药物进行综合治疗。其中,二甲双胍与 α -葡萄糖苷酶抑制剂的联用不仅降低空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),且可较好地控制餐后血糖波动,患者耐受性良好,无明显低血糖风险^[5,6]。

桑枝总生物碱 [*Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids, SZ-A] 是从中药材桑枝分离提取的有效组分中药,2020年3月,“桑枝总生物碱片”作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂类抗糖尿病药物经中国国家药品监督管理局批准上市^[7]。此外,临床前药理作用拓展研究及临床研究均发现,桑枝总生物碱用于2型糖尿病治疗的综合获益远超单纯的糖苷酶抑制剂^[8]。

本课题组前期动物实验研究显示:在2型糖尿病

KKAY小鼠中,SZ-A在剂量为100和200 mg·kg⁻¹时可表现出剂量依赖性降低餐后血糖作用^[9],Met在剂量100和150 mg·kg⁻¹时可表现出良好的降低空腹血糖作用。本研究依据前期研究基础,将采用自发性2型糖尿病动物KKAY小鼠,探究桑枝总生物碱和二甲双胍在最低有效剂量下合用时,与单药治疗相比,在改善糖代谢方面的作用特点和优势,并对联合用药的作用机制进行深入分析,为桑枝总生物碱IV期临床再评价及更好地指导口服降糖药物联合应用的方案制定提供基础研究数据支持。

材料与amp;方法

药品、仪器与试剂 盐酸二甲双胍(批号:YOL-13-321-1);SZ-A(批号:201911001,中国医学科学院药物研究所刘玉玲研究员实验室提供);高脂饲料(Research Diets公司,D12451,45 kcal% fat);葡萄糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,货号:10010518,批号:20200811);重组人胰岛素注射液-优泌林(常规型,礼来制药公司,批号:D386919A);丙酮酸钠(北京百灵威科技有限公司,货号:297561);糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin A1c, HbA1c)测定试剂盒(豪迈生物,货号:A5911);葡萄糖、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,货号:

100020100、100060102、100060092); 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、*N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶测定试剂盒 (*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAG) (南京建成生物工程研究所, 货号: C009-2-1、C010-2-1、A031-1-1); 组织细胞TG含量酶法测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, 货号: E1013); 热休克蛋白90 (heat shock protein 90, HSP90)、磷脂酰肌醇3激酶 p85 (phosphatidylinositol-3-kinase p85, PI3K p85)、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1)、磷酸化PDK1 (p-PDK1)、蛋白激酶B (protein kinase B, Akt)、磷酸化Akt (p-Akt)、葡萄糖转运蛋白4 (glucose transporter type 4, GLUT4) 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 货号: 4874、4257、3062、3438、2920、13038、2213); 葡萄糖转运蛋白2 (glucose transporter 2, GLUT2) 抗体 (Proteintech 公司, 66889-1); RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、BCA 法蛋白定量试剂盒、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (北京普利莱基因技术有限公司, C1053、P1260、P1265、P1511、C1309、C2225); 3-18K 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); HZQ-C 空气浴振荡器 (哈尔滨东明医疗仪器厂); μ -Quant 酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司); Bio Rad Power Pac Basic 电泳装置 (美国 BioRad 公司); Pyxis-Gel Processor 快速转膜系统 (Springen Biotechnology 公司); 水平摇床 (北京六一仪器厂); 恒温混匀器 (美国 Thermo Fisher 公司); ChemiScope Western Blot Imaging System (上海勤翔科学仪器有限公司)。

实验动物 自发性2型糖尿病KKAy小鼠40只, 12周龄, 雌性, 购自北京华阜康科技股份有限公司, 动物许可证编号: SCXK (京) 2019-0008。动物饲养于 SPF 级动物房, 实验操作过程均按照中国医学科学院《药物研究所动物实验中心标准操作规程》及实验动物管理和使用委员会的要求执行 (批准号: 00004332)。

动物分组及给药 根据FBG、口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 30 min 血糖升高百分数 (glycemia increase at 30 min in OGTT)、血 TG、血 TC 及体重 (body weight, BW) 等指标将小鼠分为4

组, 即模型对照组 (control, Con)、桑枝总生物碱组 (SZ-A, 100 mg·kg⁻¹)、二甲双胍组 (Met, 100 mg·kg⁻¹) 及联用组 (Comb, 100 mg·kg⁻¹ SZ-A + 100 mg·kg⁻¹ Met)。每组10只, 5只一笼喂养。各给药组灌胃相应药物, 模型对照组给予等体积蒸馏水, 每日1次, 连续7周。分组情况详见表1。

血糖测定 小鼠尾尖取血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖值。

OGTT 实验当天小鼠禁食4h, 灌胃给予葡萄糖溶液 (2.0 g·kg⁻¹)。于负荷前 (0 min) 及负荷后30、60和120 min 取血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖值, 并计算血糖-时间曲线下面积 (area under the blood glucose concentration time curve, AUC)。

胰岛素耐量试验 (insulin tolerance test, ITT) 实验当天小鼠禁食4h, 皮下注射胰岛素溶液 (0.4 U·kg⁻¹), 于注射前 (0 min) 和注射后40、90 min 取血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖值, 并计算AUC。

口服丙酮酸钠耐量试验 (oral sodium pyruvate tolerance test, OPTT) 小鼠禁食13h后, 灌胃给予丙酮酸钠溶液 (2.0 g·kg⁻¹), 于灌胃前 (0 min) 和灌胃后30、90 min 取血, 用葡萄糖氧化酶法测定血糖值, 并计算AUC。

血ALT、AST、NAG测定 给药结束后, 留取小鼠血浆, 并按照ALT、AST、NAG相应试剂盒说明书步骤进行测定。

Western blot检测相关蛋白表达水平 给药结束后留取小鼠肝脏、脂肪及肌肉组织。采用含磷酸化酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液充分裂解各组织, 提取总蛋白。采用Western blot检测目的蛋白: PI3K p85、PDK1、p-PDK1、Akt、p-Akt、GLUT2及GLUT4。

肝脏脏器指数 动物组织取材时, 称取动物体重及肝脏组织重量, 并计算脏器指数 (脏器指数 = 脏器重量/体重×100%)。

肝脏脂质含量测定 称取适量肝组织样本, 加入相应体积的生理盐水或组织裂解液制成10%肝脏匀浆液, 然后以6 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液, 按照相应试剂盒的使用说明进行TC和TG定量, 并测定蛋白含量。

Table 1 Data for animal grouping. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. FBG: Fasting blood glucose; OGTT: Oral glucose tolerance test; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; BW: Body weight; Con: Control; SZ-A: *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids, 100 mg·kg⁻¹; Met: Metformin, 100 mg·kg⁻¹; Comb: Combination, 100 mg·kg⁻¹ SZ-A + 100 mg·kg⁻¹ Met

| Group | FBG/mg·dL ⁻¹ | Glycemia increase at 30 min in OGTT/% | TC/mg·dL ⁻¹ | TG/mg·dL ⁻¹ | BW/g |
|-------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------|------------|
| Con | 356.3 ± 53.7 | 63.7 ± 19.8 | 162.5 ± 49.5 | 236.0 ± 59.0 | 44.8 ± 2.3 |
| SZ-A | 353.7 ± 51.0 | 61.8 ± 15.8 | 160.4 ± 33.9 | 240.0 ± 59.1 | 44.4 ± 2.5 |
| Met | 354.6 ± 53.5 | 57.1 ± 15.2 | 177.6 ± 38.6 | 225.0 ± 33.9 | 45.5 ± 2.4 |
| Comb | 351.3 ± 48.5 | 71.2 ± 20.1 | 187.1 ± 63.5 | 238.3 ± 62.4 | 45.7 ± 2.3 |

肝脏组织病理检测 将肝组织用多聚甲醛溶液固定,进行常规石蜡包埋、切片及苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 染色,在显微镜下观察肝脏脂肪变性情况并拍照。

统计学分析 数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。采用 GraphPad Prism 8.3 软件进行作图。

结果

1 桑枝总生物碱与二甲双胍联用明显改善 KKAY 小鼠多饮多食的症状

给药期间,每周记录 1 次各组 KKAY 小鼠的摄食及饮水量,绘制折线图。如图 1A、B 所示,与 Con 组相比, SZ-A ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 Met ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 长期给药对摄食量和饮水量无明显影响,但 Comb 组 KKAY 小鼠的摄食量和饮水量显著减少。结果提示,与单药相比, SZ-A 与 Met 联合应用能显著降低小鼠的摄食量和饮水量,改善糖尿病多饮多食的症状。

如图 1C 所示,给药初期,各组小鼠的体重无明显差异;给药 2 周后,与 Con 组相比, Comb 组体重有降低的趋势 ($P = 0.09$)。

2 桑枝总生物碱与二甲双胍联用显著降低 KKAY 小鼠血糖水平

如图 2A、B 所示,在给药 7 天时, SZ-A、Met 及 Comb 治疗对各组小鼠的随机血糖无显著影响,但均可显著降低 KKAY 小鼠的空腹血糖,且 Comb 组的降糖作用更加明显 ($P < 0.001$ vs SZ-A, $P < 0.001$ vs Met)。在给药 27 天时, SZ-A 和 Met 均可明显降低 KKAY 小鼠的

随机血糖和空腹血糖;与 SZ-A 和 Met 单药相比, SZ-A 和 Met 联合给药降低 KKAY 小鼠的随机血糖 ($P < 0.05$ vs SZ-A, $P < 0.01$ vs Met) 及空腹血糖 ($P < 0.01$ vs SZ-A, $P < 0.001$ vs Met) 的作用更加明显。

糖化血红蛋白表示 1~2 个月内的血糖控制情况,是临床糖尿病诊断的金标准。如图 2C 所示,给药第 40 天, Comb 组可明显降低 KKAY 小鼠的 HbA1c 水平 ($P < 0.001$ vs Con, $P < 0.01$ vs SZ-A, $P < 0.01$ vs Met),但在给药 40 天时, SZ-A 和 Met 单药组对 HbA1c 的降低作用仍不明显。

上述结果提示: SZ-A 与 Met 联合给药可明显降低 KKAY 小鼠的随机血糖和空腹血糖,长期给药可有效地控制血糖水平,且作用优于 Met 和 SZ-A 单药。

3 桑枝总生物碱与二甲双胍联用可改善 KKAY 小鼠口服葡萄糖耐量

采用口服葡萄糖耐量试验,观察各组小鼠的葡萄糖耐受能力。如图 3A 所示, SZ-A、Met 及联合给药均可明显降低 0 min 及葡萄糖负荷 30、60 min 的血糖。如图 3B 所示, SZ-A、Met 和 Comb 组的 AUC 显著低于 Con 组;而且与 SZ-A 及 Met 相比, SZ-A 与 Met 联合给药降低 AUC 的作用更加明显 ($P = 0.09$ vs SZ-A, $P < 0.05$ vs Met)。此结果表明, SZ-A 与 Met 联合给药可改善 KKAY 小鼠的口服葡萄糖耐量,且作用优于 SZ-A 与 Met 单药。

4 桑枝总生物碱与二甲双胍联用可改善 KKAY 小鼠胰岛素敏感性

如图 4 所示,与 Con 组比较, SZ-A、Met 组皮下注射胰岛素后 40、90 min 的血糖和 AUC 有降低趋势。与单药组相比, Comb 组皮下注射胰岛素后的 40、90 min 血糖和 AUC 明显低于 SZ-A 组 ($P < 0.001$, $P < 0.01$,

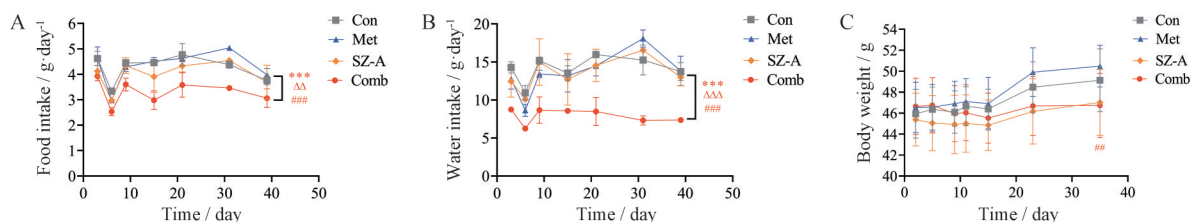


Figure 1 Effects of SZ-A and Met on food intake (A), water intake (B) and body weight (C) in KKAY mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Con; ΔΔ $P < 0.01$, ΔΔΔ $P < 0.001$ vs SZ-A; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Met

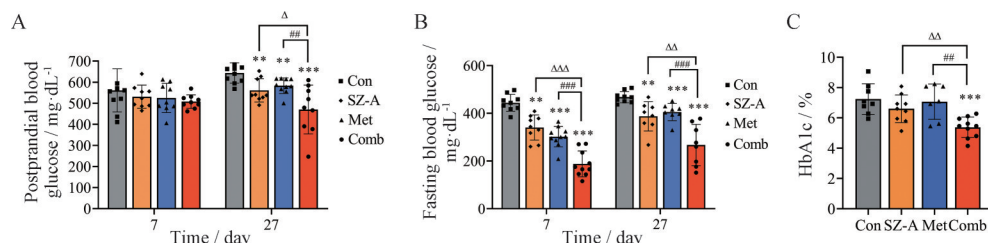


Figure 2 Effects of SZ-A and Met on postprandial blood glucose (A), fasting blood glucose (B) and glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c, C) in KKAY mice. $n = 7-10$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, ΔΔΔ $P < 0.001$ vs SZ-A; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Met

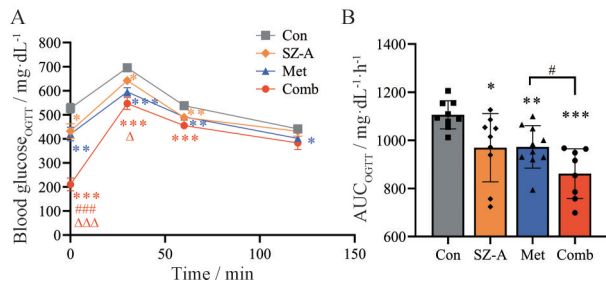


Figure 3 Effects of SZ-A and Met on glucose tolerance in KKAY mice. A: Blood glucose; B: AUC during OGTT of KKAY mice. $n = 8-10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs SZ-A; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs Met. AUC: Area under the blood glucose concentration time curve

$P < 0.001$) 与 Met 组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果提示, SZ-A 与 Met 联合给药能显著改善 KKAY 小鼠外周组织对胰岛素的敏感性, 且作用优于 SZ-A 和 Met 单药。

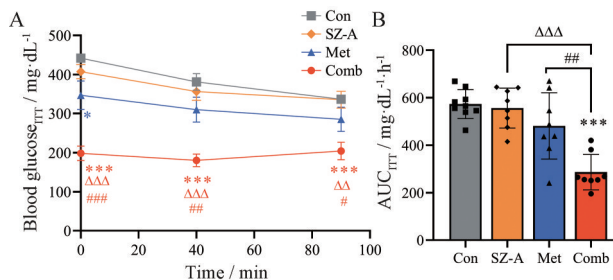


Figure 4 Effects of SZ-A and Met on insulin tolerance in KKAY mice. A: Blood glucose; B: AUC during ITT of KKAY mice. $n = 6-10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Con; $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs SZ-A; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Met. ITT: Insulin tolerance test

5 桑枝总生物碱与二甲双胍联用有效抑制 KKAY 小鼠糖异生过程

如图 5 所示, 与 Con 组相比, SZ-A、Met 及 Comb 组小鼠的 0 min 血糖及丙酮酸钠负荷后 30、90 min 血糖及 AUC 均显著降低。Comb 组降低口服丙酮酸钠后 AUC 的作用与单药 Met 效果相似, 但作用优于 SZ-A 单药组 ($P < 0.001$)。由此可知, SZ-A 和 Met 联合给药可显著抑制糖异生过程, 其作用主要源于 Met 对糖异

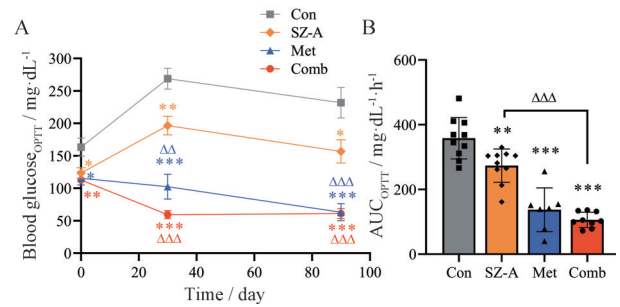


Figure 5 Effects of SZ-A and Met on pyruvate tolerance in KKAY mice. A: Blood glucose; B: AUC during OPTT of KKAY mice. $n = 7-10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs SZ-A. OPTT: Oral sodium pyruvate tolerance test

生的抑制作用。

6 桑枝总生物碱与二甲双胍联用可改善 KKAY 小鼠肝肾功能

血转氨酶水平及血 NAG 水平分别是反映肾功能的重要指标。实验结束后, 取小鼠血浆测定转氨酶及 NAG 水平, 结果如图 6 所示, 与 Con 组相比, Met 和 Comb 组小鼠血 ALT、AST、NAG 水平显著下降, 提示联合给药可以显著改善小鼠肝肾功能, 且其作用主要来源于二甲双胍。

7 桑枝总生物碱与二甲双胍联用对 KKAY 小鼠外周组织胰岛素信号通路 PI3K/PDK1/Akt/GLUT 作用轴中关键因子蛋白表达水平的影响

7.1 桑枝总生物碱与二甲双胍联用对肝脏组织中相关蛋白表达的影响 如图 7 所示, 与 Con 组相比, SZ-A 和 Comb 组小鼠肝脏组织中胰岛素受体及其下游信号通路关键因子 PI3K 的调节亚基 p85 及 p-PDK1 的蛋白表达水平显著上调, 而 Met 对此无明显影响。与 Con 组相比, p-Akt (T308)/Akt 水平在各给药组均有一定程度上调, 其中, SZ-A 与 Met 联合应用组上调显著, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。与各单药相比, SZ-A 与 Met 联合应用还可显著上调小鼠肝脏中 GLUT2 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。由此可知, SZ-A 与 Met 联合给药可明显激活 KKAY 小鼠肝脏组织 PI3K/PDK1/Akt/GLUT2 信号

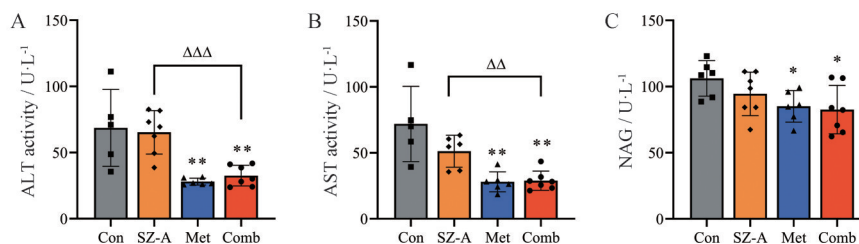


Figure 6 Effects of SZ-A and Met on liver and kidney function in KKAY mice. A: Alanine aminotransferase (ALT); B: Aspartate aminotransferase (AST); C: *N*-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). $n = 5-7$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con; $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs SZ-A

通路,与单药相比,SZ-A与Met联合用药后对p-Akt及GLUT2的调节作用更加明显($P < 0.05$),提示联合用药对外周组织细胞葡萄糖摄取环节关键因子具有更显著的调控作用。

7.2 桑枝总生物碱与二甲双胍联用对肌肉组织中相关蛋白表达的影响 基于对肝脏组织中关键因子的考察结果,在肌肉组织中,重点检测组织特异性糖转运体GLUT4的表达,如图8所示,SZ-A和Met联合给药可明显上调KKAy小鼠肌肉组织GLUT4蛋白表达($P < 0.01$ vs Con, $P < 0.05$ vs SZ-A, $P = 0.056$ vs Met)。同时,与Con组相比,各给药组p-PDK1蛋白水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$),p85及p-Akt(T308)/Akt蛋白表达水平有升高趋势。结果提示,SZ-A和Met联用后亦可显著促进KKAy小鼠肌肉组织PI3K/

PDK1/Akt/GLUT信号通路,特别是能显著上调肌肉组织糖摄取关键转运体GLUT4的蛋白表达。

7.3 桑枝总生物碱与二甲双胍联用对脂肪组织中相关蛋白表达的影响 同上,针对脂肪组织PI3K/PDK1/Akt/GLUT信号通路的检测结果如图9所示,p85和GLUT4蛋白表达水平各组间无显著性差异。与Con组相比,各给药组均可显著增加p-PDK1蛋白水平($P < 0.01$);SZ-A与Met联合给药可升高p-Akt(T308)/Akt蛋白表达水平($P = 0.06$ vs Con)。结果提示:SZ-A和Met联合给药后亦会一定程度上上调KKAy小鼠脂肪组织PDK1/Akt的蛋白活化形式。

8 桑枝总生物碱与二甲双胍联用对KKAy小鼠肝脏组织病理形态、脏器指数及肝脏脂质含量的影响

HE结果(图10A)显示,Con组小鼠肝细胞肿大,

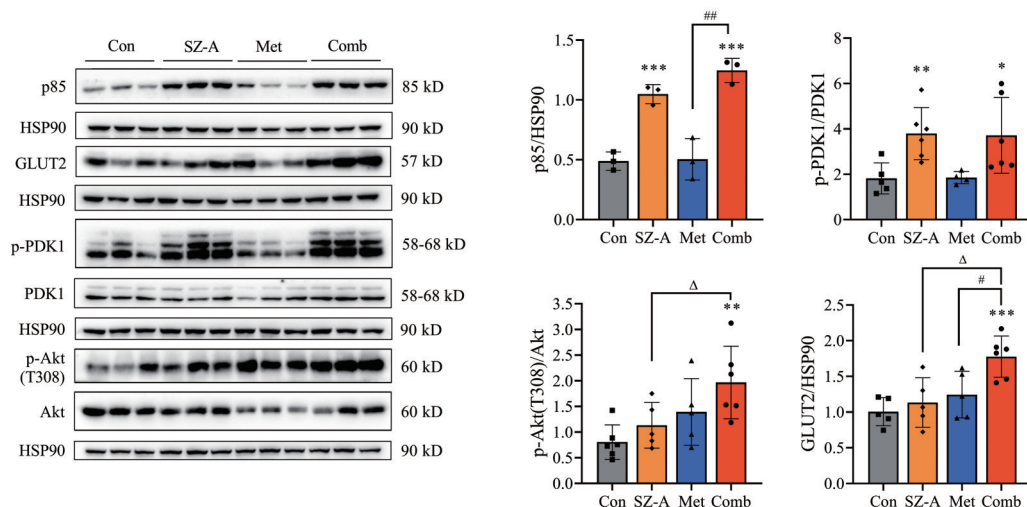


Figure 7 Effects of SZ-A and Met on PI3K, p-PDK1, PDK1, p-Akt, Akt and GLUT2 expression in liver of KKAY mice. Protein expression levels were detected by Western blot. $n = 3-6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; $^{\Delta}P < 0.05$ vs SZ-A; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ vs Met. PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; PDK1: Phosphoinositide-dependent protein kinase 1; Akt: Protein kinase B; GLUT2: Glucose transporter 2; HSP90: Heat shock protein 90

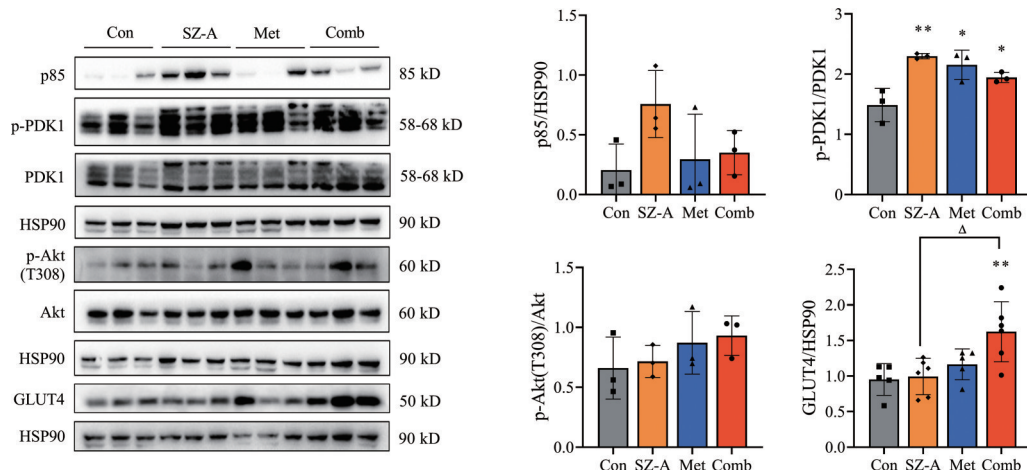


Figure 8 Effects of SZ-A and Met on PI3K, p-PDK1, PDK1, p-Akt, Akt and GLUT4 expression in skeletal muscle of KKAY mice. Protein expression levels were detected by Western blot. $n = 3-6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con; $^{\Delta}P < 0.05$ vs SZ-A

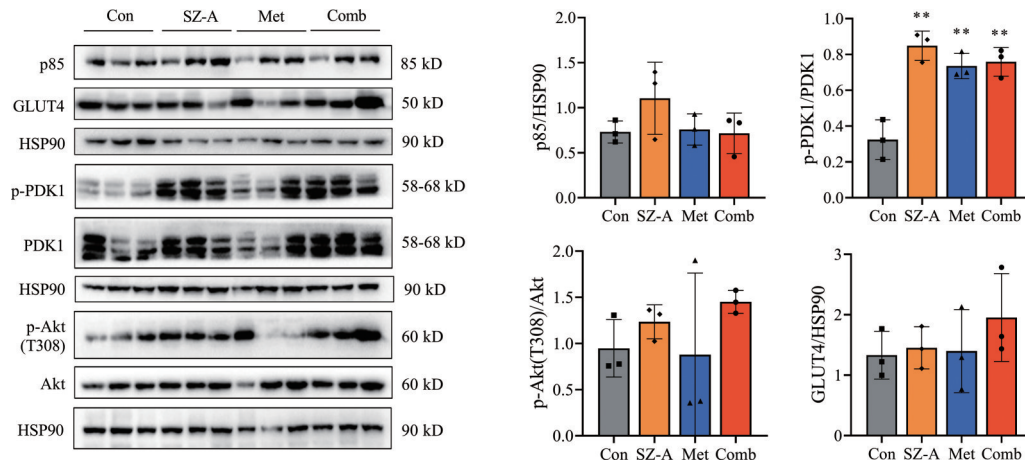


Figure 9 Effects of SZ-A and Met on PI3K, p-PDK1, PDK1, p-Akt, Akt and GLUT4 expression in adipose of KKAy mice. Protein expression levels were detected by Western blot. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs Con

肝脏结构紊乱,肝细胞呈明显脂肪变性,胞质内充满大量圆形脂肪泡,脂滴将细胞核挤压至细胞边缘。给药组小鼠肝脏结构完整性及脂肪变性较Con组有明显的改善,其中联合给药组改善更为明显。同时,肝脏组织脂质含量测定结果(图10B、C)显示,与Con组相比,联合用药组KKAy小鼠肝脏内的TC含量显著降低($P < 0.001$),且优于SZ-A单药及Met单药;联合用药组KKAy小鼠肝脏内的TG含量显著降低($P < 0.01$),且优于Met单药。与Con组相比,各给药组的小鼠的肝重及肝脏脏器指数无明显差异(10D、E)。结果提示,SZ-A与Met联合给药对KKAy小鼠的肝脏大小及肝重无影响,但可以显著改善小鼠肝脏脂质堆积状态。

讨论

桑枝总生物碱作为天然药物组分,具有天然药物独特的多靶点、多重药理作用的优势。SZ-A的主要作用靶点是肠道的糖苷酶,但前期研究中亦发现,SZ-A可改善KKAy小鼠的糖脂代谢,改善胰岛的功能及形态^[9];SZ-A亦可阻断巨噬细胞MAPK信号通路的激活^[10],改善KKAy小鼠机体炎症状态及肠道微生态^[11]。此外,SZ-A的主碱成分为1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)、莽麦碱(fagomine, FAG)和1,4-二脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇(1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, DAB)^[10],对SZ-A上述成分的药理作用研究发现,DAB与FAG可促进C57小鼠原代胰岛细胞及MIN6细胞的胰岛素分泌^[9];且DNJ、FAG和DAB均可在脂多糖诱导的巨噬细胞炎症状态下发挥抗炎作用^[10]。SZ-A作为新上市的降糖药物,目前正处于临床IV期研究阶段,其更多的临床应用特点和长期益处尚待挖掘。鉴于临床上糖尿病患者病情的进行性恶化,一般单药治疗很难持续将血糖控制在正常水平,往往

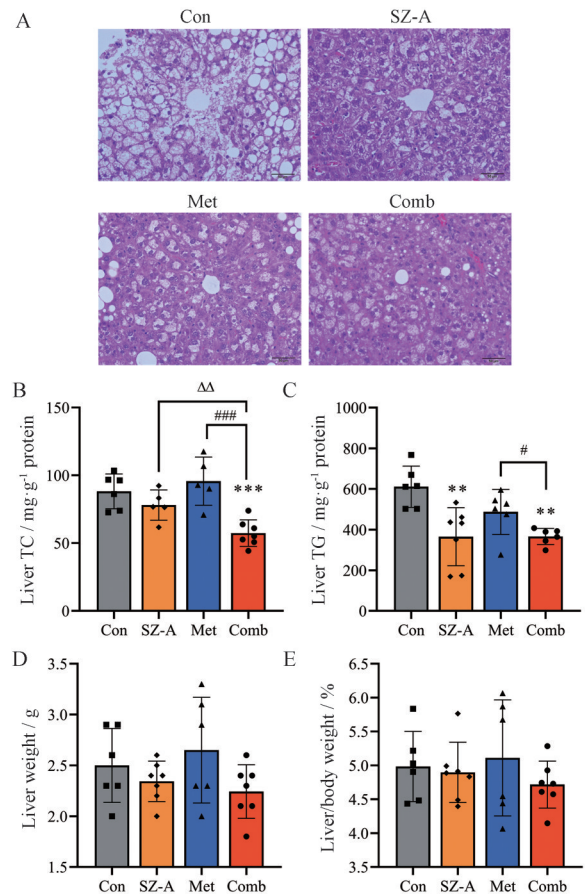


Figure 10 Effects of SZ-A and Met on pathology, organ index and lipid content of liver in KKAy mice. A: Hematoxylin and eosin (H&E) staining ($\times 400$). Scale bar: 50 μm ; B, C: TC (B) and TG (C) content of liver in KKAy mice; D: Liver weight; E: Organ index. $n = 6-7, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs SZ-A; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs Met

需要在一线用药的基础上联合其他降糖药物以控制血糖^[12]。目前,二甲双胍联合其他西药或中药的降糖有效性及安全性有多项基础及临床研究^[5,6,13-18],且有多

种二甲双胍复方制剂也已上市^[19],但目前尚缺乏二甲双胍与SZ-A联合应用的抗糖尿病作用特点研究及实验数据,本研究小组作为桑枝总生物碱片的临床前药理学研究负责团队,基于前期多项动物实验研究基础,采用自发性2型糖尿病动物模型KKAy小鼠,评估SZ-A与Met在最低有效剂量下的联合用药的抗糖尿病作用特点。KKAy小鼠是一种以高血糖、高胰岛素血症及高脂血症为主要特征的T2DM模型动物,常用于研究抗糖尿病候选药物对糖脂代谢的影响及作用机制探究。

本研究结果显示,与各单药治疗相比,SZ-A与Met联合应用能显著降低KKAy小鼠的空腹血糖、随机血糖及糖化血红蛋白水平,长期给药能更好地控制KKAy小鼠的血糖波动,并且改善其胰岛素敏感性。研究发现,SZ-A与Met联合给药改善口服葡萄糖耐量的作用与SZ-A相当,但显著优于二甲双胍;同时二者联用抑制糖异生的作用与Met相当,但显著优于SZ-A。表明SZ-A与Met联合给药改善OGTT的作用主要源自SZ-A,抑制糖异生的作用主要源自Met,二者联用能够使二者作用互为补充、协同增效,更好地控制机体糖代谢紊乱。

为了探讨SZ-A与Met联合用药后改善机体糖代谢协同增效的作用机制,在给药结束后,本研究重点考察了KKAy小鼠参与糖代谢的主要外周组织(包括肝脏、肌肉和脂肪)中相关信号通路关键因子的表达变化。在外周组织对血液中胰岛素响应及摄取葡萄糖的过程中,PI3K/Akt信号通路发挥核心作用,且该通路参与调节了包括生长因子和胰岛素介导细胞生长、葡萄糖摄取、代谢等多个生理环节^[20]。该通路的下游因子PDK1是PI3K主要的下游激酶,亦是激活Akt的重要激酶之一,其磷酸化活化状态对于血糖稳态也具有重要意义。有研究表明,肝脏特异性敲除PDK1的小鼠表现出糖耐量异常^[21]。PDK1可磷酸化Akt的第308位苏氨酸磷酸化位点(Thr-308)^[22],而细胞中Akt激活后可促进组织特异性葡萄糖转运蛋白(GLUT)的表达和易位^[20,23]。其中, GLUT2是肝细胞的葡萄糖转运体^[24], GLUT4是脂肪组织及骨骼肌中表达最丰富的葡萄糖转运蛋白。有研究表明,过表达GLUT4可改善糖尿病小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性^[25,26]。本研究对KKAy小鼠肝脏、脂肪及肌肉组织中PI3K/PDK1/Akt/GLUT通路的关键蛋白的表达进行检测,结果显示,与两个单药相比,SZ-A和Met联合应用均可增加小鼠肝脏、肌肉及脂肪组织中p-PDK1和p-Akt(T308)/Akt的蛋白表达水平,特别是在肝脏组织中,其联用时显著增加p-Akt(T308)/Akt的水平,提示联合用药在改善KKAy小鼠外周组织胰岛素信号通路上游信号因子的作用较明显;更有趣的是,本研究发现SZ-A和Met联合用药对

几种外周组织中糖摄取关键转运蛋白GLUT的蛋白水平均有显著的上调作用,包括对肝脏组织中GLUT2和肌肉中的GLUT4的上调作用;研究认为, GLUT2是一种胰岛素非依赖性跨膜载体蛋白,而GLUT4是一种胰岛素依赖性跨膜载体蛋白,均可促进葡萄糖跨细胞膜移动。因此,SZ-A和Met联合用药可同时增加外周组织多种GLUT的表达上调,可协同作用于胰岛素依赖和非依赖途径外周组织的糖摄取和利用,这可能是联合用药后改善糖代谢协同增效作用的主要作用机制特点之一。

文献^[27-29]报道,肝脏脂质堆积也与糖代谢及肝脏胰岛素敏感性密切相关,因此,本研究还考察了各组小鼠的肝脏组织病理形态、肝脏脂质含量及血转氨酶水平。结果提示,SZ-A与Met联合给药可以改善肝脏脂质堆积及肝脏损伤。

因此,本研究结果表明:SZ-A与Met联合给药可能通过激活外周组织的PI3K/PDK1/Akt/GLUT信号通路来促进肝脏、肌肉及脂肪对葡萄糖的摄取,从而发挥降糖作用。后续研究工作将在小鼠肝细胞及肌细胞水平上,进一步验证SZ-A与Met联用活化PI3K/PDK1/Akt通路及上调GLUT2及GLUT4表达的确切作用机制,并深入探讨SZ-A中发挥激活PI3K/PDK1/Akt/GLUT2信号转导通路的具体单一组分。

综上所述,SZ-A与Met联合应用可通过激活PI3K/PDK1/Akt/GLUT信号通路改善KKAy小鼠的糖代谢紊乱状态,并可调节肝脏脂质代谢紊乱,其作用显著优于SZ-A或Met单药。本研究所观察到SZ-A与Met联用在2型糖尿病动物中的药理作用特点,为二者联合用药及复方制剂的开发提供了前期数据支持,并提示在进行SZ-A的IV期临床应用时,或可尝试将其用于二甲双胍单独应用血糖控制不佳的2型糖尿病患者,通过联合用药增强对空腹及餐后高血糖的控制作用。

作者贡献:陈蕾蕾负责完成相关实验及论文撰写;雷丽冉协助动物实验及指标检测;刘泉、李彩娜负责实验数据分析与作图;雷蕾、环奕负责实验方案优化及论文写作指导;刘玉玲负责样品提供、质量控制及课题指导;申竹芳负责课题指导;曹慧、刘率男指导实验方案设计并进行论文写作及修改。

利益冲突:无任何利益冲突。

References

- [1] Wang XL. Practical Molecular Pharmacology (应用分子药理学) [M]. 2nd ed. Beijing: China Union Medical University Press, 2015: 310.
- [2] Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 6275.
- [3] Ahmad E, Lim S, Lamptey R, et al. Type 2 diabetes [J]. Lancet,

- 2022, 400: 1803-1820.
- [4] Zhu DL. Guideline for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus in China (2020 edition) (Part 1) [J]. *Chin J Pract Intern Med (中国实用内科杂志)*, 2021, 41: 668-695.
- [5] Wang JS, Huang CN, Hung YJ, et al. Acarbose plus metformin fixed-dose combination outperforms acarbose monotherapy for type 2 diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 102: 16-24.
- [6] Oh TJ, Yu JM, Min KW, et al. Efficacy and safety of voglibose plus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial [J]. *Diabetes Metab J*, 2019, 43: 276-286.
- [7] Shen ZF. Research progress of *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids in the treatment of diabetes [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2021, 35: 725.
- [8] Qu L, Liang X, Tian G, et al. Efficacy and safety of mulberry twig alkaloids tablet for the treatment of type 2 diabetes: a multicenter, randomized, double-blind, double-dummy, and parallel controlled clinical trial [J]. *Diabetes Care*, 2021, 44: 1324-1333.
- [9] Lei L, Huan Y, Liu Q, et al. *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids promote insulin secretion, restore diabetic β -cell function by preventing dedifferentiation and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 841981.
- [10] Cao H, Ji W, Liu Q, et al. *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) exert anti-inflammatory effects *via* regulation of MAPK signaling in macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114483.
- [11] Liu Q, Liu S, Cao H, et al. *Ramulus mori* (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) ameliorate glucose metabolism accompanied by the modulation of gut microbiota and ileal inflammatory damage in type 2 diabetic KKAy mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 642400.
- [12] Turner RC, Cull CA, Frighi V, et al. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group [J]. *JAMA*, 1999, 281: 2005-2012.
- [13] Müller-Wieland D, Kellerer M, Cypryk K, et al. Efficacy and safety of dapagliflozin or dapagliflozin plus saxagliptin *versus* glimepiride as add-on to metformin in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20: 2598-2607.
- [14] Matthews DR, Paldánus PM, Proot P, et al. Glycaemic durability of an early combination therapy with vildagliptin and metformin *versus* sequential metformin monotherapy in newly diagnosed type 2 diabetes (VERIFY): a 5-year, multicentre, randomised, double-blind trial [J]. *Lancet*, 2019, 394: 1519-1529.
- [15] Xie J, Li N, Jiang X, et al. Short-term efficacy and safety of repaglinide *versus* glimepiride as augmentation of metformin in treating patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 519-526.
- [16] Sartore G, Ragazzi E, Antonello G, et al. Effect of a new formulation of nutraceuticals as an add-on to metformin monotherapy for patients with type 2 diabetes and suboptimal glycemic control: a randomized controlled trial [J]. *Nutrients*, 2021, 13: 2373.
- [17] Shiming Z, Mak KK, Balijepalli MK, et al. Swietenine potentiates the antihyperglycemic and antioxidant activity of metformin in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111576.
- [18] Hong MK, Han Y, Park HJ, et al. The synergistic action of metformin and *Glycyrrhiza uralensis* Fischer extract alleviates metabolic disorders in mice with diet-induced obesity [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 936.
- [19] Li YJ, Lu HM, Feng YJ. Progress on clinical application of compound antidiabetic drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Pract Med (实用医学杂志)*, 2014, 30: 2330-2332.
- [20] Huang X, Liu G, Guo J, et al. The PI3K/Akt pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 1483-1496.
- [21] Mora A, Lipina C, Tronche F, et al. Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure [J]. *Biochem J*, 2005, 385: 639-648.
- [22] Bayascas JR. PDK1: the major transducer of PI3-kinase actions [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 346: 9-29.
- [23] Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 31-44.
- [24] Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis [J]. *Diabetologia*, 2015, 58: 221-232.
- [25] Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, et al. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 22243-22246.
- [26] Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, et al. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle [J]. *Diabetes*, 1996, 45: 28-36.
- [27] Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases [J]. *Cell Metab*, 2018, 27: 22-41.
- [28] Tsuchida T, Shiraishi M, Ohta T, et al. Ursodeoxycholic acid improves insulin sensitivity and hepatic steatosis by inducing the excretion of hepatic lipids in high-fat diet-fed KK-Ay mice [J]. *Metabolism*, 2012, 61: 944-953.
- [29] Yu HC, Hou SC, Cui B, et al. Research progress on the role of bile acids in regulating glycolipid metabolism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1419-1430.