

桑叶对 2 型糖尿病大鼠肝脏 Toll 样受体及其下游信号元件基因表达的影响

王 敏¹ 马全涛¹ 李亚琪¹ 柳辰玥¹ 张 驰¹ 邱敏懿¹ 张彩娟¹ 王 停² 赵保胜² 李红燕³

(1 北京中医药大学中药学院,北京,102488; 2 北京中医药大学/北京中医药研究院,北京,10029;

3 北京中医药大学第三附属医院,北京,100029)

摘要 目的:观察桑叶降糖作用,分析桑叶对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠肝脏 Toll 样受体及其下游信号元件基因表达的影响,初步探讨其降糖机制。方法:选取 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 46 只,高脂饲料饲喂 8 周后,腹腔注射链脲佐菌素(STZ),以制备 T2DM 模型。根据血糖值将模型大鼠随机分成模型组、阳性药二甲双胍(0.2 g/kg)组和桑叶高、低剂量(3 g/kg,1 g/kg)组,每组 12 只,另取 10 只大鼠为正常对照组。灌胃给药,持续 12 周,每周测其空腹血糖,并于第 11 周时进行 OGTT 和 ITT 实验。以上实验结束后免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定血清中胰岛素、IL-6、肿瘤坏死因子-(TNF-)和 C 反应蛋白(CRP)水平,实时 PCR 法测定大鼠肝脏 TLRs 及 MyD88、TRAF-6、核因子-B mRNA 水平。结果:大鼠给药桑叶后,血糖值降低,饮水量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),糖耐量得到显著改善,血清中 IL-6、CRP 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),TLR7、TLR8、TLR9 及其下游信号元件 TRAF-6、MyD88、核因子-B mRNA 相对表达均较模型组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:桑叶降糖可能与其抑制肝脏组织 TLRs 及其下游信号表达,降低炎症反应有关。

关键词 桑叶;2 型糖尿病;大鼠;肝脏;胰岛素抵抗;炎症反应;Toll 样受体;mRNA

Effects of Folium Mori on the Gene Expression of TLRs and its Downstream Signaling Elements in Liver of T2DM Rats

Wang Min¹, Ma Quantao¹, Li Yaqi¹, Liu Chenyue¹, Zhang Chi¹, Qiu Minyi¹, Zhang Caijuan¹,

Wang Ting², Zhao Baosheng², Li Hongyan³

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2 Beijing Institute

of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Third Affiliated Hospital,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the hypoglycemic effect of Folium Mori, and analyze its effects on the gene expression of toll-like receptor and its downstream signaling element in the liver from type 2 diabetic rats, and to explore its action mechanism of hypoglycemic. **Methods:** The rats were fed with high-fat fodder for 8 weeks, and then were given intraperitoneal injection (ig) with streptozotocin (STZ) to establish the T2DM rats model. The diabetic rats were divided into model group, metformin (0.2 g/kg) group, Folium Mori high and low dose groups (3 g/kg, 1 g/kg), with 12 rats in each group, and another 10 rats were selected as the normal control group. The drugs were given by ig administration for 12 weeks, and the fasting blood glucose was detected every week. Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were conducted in the mid and later phases of experiment. After the experiment, serum insulin, TNF-, IL-6 and CRP were detected, and the expression level of TLRs and MyD88, TRAF-6, NF-B in the liver were detected by real-time PCR method. **Results:** After the intervention by Folium Mori, the amount of blood glucose and water intake were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the glucose tolerance was improved, the contents of IL-6 and CRP in serum were decreased significantly ($P < 0.05$). The expressions of TLR7, TLR8, TLR9 and TRAF-6, MyD88, NF-B were decreased obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Folium Mori can ameliorate diabetes, and its mechanism may be by inhibiting the expression of TLRs and its downstream signal in liver tissue.

Key Words Folium Mori; Type 2 diabetic mellitus; Rat; Liver; information retrieval; inflammation; TLRs; mRNA

中图分类号:R282;R587 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.037

糖尿病是由于遗传或环境等多种因素引起机体胰岛素分泌量相对或绝对减少,导致糖类、脂类及蛋白质类等物质代谢紊乱而产生的慢性疾病。城市化,老龄化以及人民生活节奏的加快使糖尿病发病率呈上升趋势。最新报告显示,中国成年人中约有 1.14 亿糖尿病患者,发病率高达 10.4%,其中约 90% 为 2 型糖尿病(T2DM),糖尿病已成为严重威胁

我国人民生命健康的非传染性疾病之一^[1]。

T2DM 的发病机制暂无定论,其主要病理特征之一为胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)。IR 即胰岛素调控葡萄糖代谢的生物学效应降低,机体代偿性分泌胰岛素以维持血糖稳定,贯穿于 T2DM 的全过程^[2]。肝脏是胰岛素作用的主要器官,也是发生 IR 的重要场所^[3]。IR 的发生与诸多因素有关,炎症

基金项目:国家自然科学基金项目(81773960)

作者简介:王敏(1991.05—),男,硕士在读,研究方向:中药防治糖尿,E-mail:WeMe9916@163.com

通信作者:赵保胜(1973.08—),男,博士,研究员,研究方向:中药防治糖尿病及新药研发,E-mail:zhaobs1973@163.com;李红燕

(1972.01—),女,学士,副主任药师,研究方向:药事管理临床药学,E-mail:Newyx2016@126.com

反应是其中之一^[4]。炎症反应是人体的重要防御机制,机体遭受侵袭后,激活免疫细胞,产生并释放肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α),白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 以及 C 反应蛋白 (C-reactive Protein, CRP) 等炎症反应递质进行自我保护。Toll 样受体 (Toll-like Receptors, TLRs) 是免疫应答中重要的模式识别受体,其与配体结合后,可通过髓样分化因子 (Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88) 依赖性信号途径或 MyD88 非依赖性信号途径转导,激活核因子- κ B,诱导分泌炎症反应递质^[5],干扰胰岛素信号的传递,导致或加重 IR^[6]。

桑叶为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的叶,味苦、甘,性寒,归肺、肝经,有疏风散热、清肺润燥、清肝明目之效,为临床常用中药,其用于糖尿病的治疗最早载于《本草纲目》,言曰:“桑叶……明目长发,止消渴”。中医“消渴证”与现代医学糖尿病特征相似^[7]。临床研究表明,桑叶及其配方治疗 T2DM 药效显著^[8-9],对 T2DM 并发症亦有一定的防治作用^[10-11]。桑叶体内含有生物碱、黄酮以及多糖^[12-13],可通过抑制葡萄糖吸收^[14],抑制 B 细胞凋亡^[15],改善 PI3K 信号转导等途径实现降糖作用^[16]。同时有报道桑叶可以通过抑制炎症反应递质的表达而降低血糖^[17],但是桑叶抗炎降糖的作用机制研究鲜有报道。本课题组前期研究发现,桑叶可降低自发性糖尿病模型 KK^{Ay} 小鼠胰腺组织中 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达^[18],后续实验中又发现桑叶可降低 T2DM 小鼠肝脏组织中 TLR7、TLR8、TLR9 的表达^[19]。因此,本实验拟在前期实验的基础上,进一步探究桑叶对 TLRs 受体及其下游信号元件表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,体重 180~200 g,斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0002,饲养于北京中医药大学屏障环境动物房,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2016-0038。

1.1.2 药物 桑叶(经北京中医药大学中药学院中药鉴定系刘春生教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶),由北京仟草中药饮片有限公司提供;二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:AA18173)。

1.1.3 试剂与仪器 链脲佐菌素 (STZ) (美国 Sigma,批号:WXBB6772V);稳豪 ONE TOUCH 血糖试纸[强生(上海)医疗器材有限公司,批号:4002886];无水葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:

20110104);生物合成人胰岛素注射液[诺和诺德(中国)制药有限公司,批号:EVG4950];大鼠 ELISA 胰岛素试剂盒(美国 ALPCO,批号:04857);大鼠 ELISA TNF-试剂盒(美国 Life Technologies,批号:1818268A);大鼠 ELISA IL-6 试剂盒(美国 Life Technologies,批号:1780090B);大鼠 ELISA CRP 试剂盒(美国 Life Technologies,批号:0739103116);Trizol 试剂(美国 Invitrogen,批号:15596);cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo Scientific,批号:00279105);SYBR Green 试剂盒(Applied Biosystems,批号:1508501);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Scientific);CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad);Biofuge Primo 型离心机(美国 Thermo Scientific)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 大鼠适应性饲养 1 周后,随机选取 10 只为正常组,维持饲料喂养,其余大鼠高脂饲料喂养 8 周后,禁食 14 h,腹腔注射 1% STZ 柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L, pH 4.2~4.5, 4℃),剂量为 20 mg/kg 体重,正常对照组仅腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液。注射后第 7 天剪尾采血,测定大鼠空腹血糖,血糖值大于 12 mmol/L 即视为造模成功。大鼠按空腹血糖值随机分为模型组、二甲双胍(0.2 g/kg)组、桑叶高剂量(3 g/kg)组和桑叶低剂量(1 g/kg)组,每组 12 只。

1.2.2 给药方法 称取桑叶 5 kg,加 10 倍质量的去离子水,85℃ 煎煮 10 h,加热回流 90 min,过滤,浓缩至相当于生药量 3.75 mg/mL。灌胃给药,1 次/d,连续 12 周,正常组和模型组给予等量动物饮用水。

1.2.3 检测指标与方法 1)一般指标检测:每周测定大鼠体重及 24 h 内进食量和饮水量各 1 次,给药 11 周各组禁食不禁水 12 h 后进行空腹葡萄糖耐量实验(OGTT),灌胃给药,1 g/kg 葡萄糖溶液,测定 0、15、30、60、90、120 min 内各组血糖值。给药第 12 周禁食不禁水 12 h 后进行胰岛素耐量实验(ITT),灌胃给药,75 U/kg 胰岛素,测定 0、15、30、60、90、120 min 各组血糖值。上述实验结束后,禁食 14 h 后,腹主动脉取血,低温离心取血清,根据试剂盒说明书要求测定血清中胰岛素、TNF- α 、IL-6、CRP 水平。2)TLR7、TLR8、TLR9、MyD88、TRAF-6、NF- κ B mRNA 的水平测定:大鼠麻醉后取肝脏最大叶,-80℃ 保存。Trizol 法提取肝脏组织总 RNA,核酸蛋白紫外分光仪检测 RNA 浓度及完整性。NCBI 数据库查询大鼠 RNA 总序列并设计引物,引物由北京博迈德基因技术有限公司合成。各引物序列如下:

β-actin 上游 5-CCAGCCATGTACGTTGCTATC-CAG-3,下游 5-GGAACCGCTCATTGCCAATGGTGA-3,TLR7 上游 5-GTGTGCACCAAGAGGCTACA-3,下游 5-TGGCCCAGGTAGAGTAGATTTC-3,TLR8 上游 5-CTGTGGAATGCCAAATGATGG-3,下游 5-TCATTTCTC-CCCAAGTCCAG-3,TLR9 上游 5-TGCAGGAGCTGAA-CATGAAC-3,下游 5-ATTGGACAGGTCCACAAAG C-3,MyD88 上游 5-GTGGTGGTTGTTCTGACGAT-3,下游 5-CGCAGATACTGATGAACCGTAG-3,TRAF-6 上游 5-CATTGTGAATTCGCTCTAGTGA-3,下游 5-GGA-CAGCTTTGATCGTGGA-3,核因子-B 上游 5-GAAGAAGCGAGACCTGGAG-3,下游 5-TCCGGAA-CACAATGGCCAC-3。按照 SYBR Green 试剂盒要求,使用 PCR 扩增仪,于 20 μL 反应体系进行扩增。每个样本设定 2 个平行孔,取其均数计算 CT 值,按照如下 Pfaffl 公式计算目的基因表达量^[20]。

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{calibrator-test})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{calibrator-test})}$$
$$\Delta CT_{\text{target}}(\text{calibrator-test}) = (CT_{\text{target}})_{A549} - (CT_{\text{target}})_{A549\text{PTX}}$$
$$\Delta CT_{\text{ref}}(\text{calibrator-test}) = (CT_{\text{ref}})_{A549} - (CT_{\text{ref}})_{A549\text{PTX}}$$

其中 E_{target}、E_{ref}分别为目的基因和内参基因的扩增效率。

1.3 统计学方法 采用 SAS 9.2 统计软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。若符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析;根据方差是否齐性,组间比较分别采用 LSD 或者 DUNETT's T3。数据若不符合正态,均数及组间比较采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组 T2DM 大鼠体重及饮水进食比较 实验中,部分大鼠在实验后期出现了低血糖死亡,所以最

终统计的动物数量出现了差异。由于桑叶起效较慢,前期大鼠各项指标变化不明显,因此仅列出第 12 周的数据。与正常对照组比较,模型组体重明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),血糖值、饮水量和进食量均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组血糖和进食、饮水量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但体重变化不明显;桑叶组血糖和饮水量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但体重和进食量变化不明显。见表 1。

2.2 5 组 T2DM 大鼠糖耐量和胰岛素耐量比较

第 11 周,与正常对照组比较,模型组出现明显的糖耐量异常,差异有统计学意义($P < 0.05$),曲线下面积高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组糖耐量改善明显,曲线下面积缩小明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),桑叶高剂量组 90 min 和 120 min 时血糖值明显降低,曲线下面积出现明显差异,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 5 组 T2DM 大鼠血清胰岛素含量及胰岛素耐量比较 注射胰岛素后,与正常组对照比较,模型组为明显的胰岛素耐量异常,差异有统计学意义($P < 0.05$),AUC 明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其空腹胰岛素含量明显升高,胰岛素抵抗指数显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组和桑叶高剂量组 AUC 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),血清胰岛素含量明显下降,胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、4。

表 1 5 组 T2DM 大鼠体重及饮水进食比较($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	饮水(g)	进食(g)	血糖(mmol/L)
正常对照组($n=8$)	615.78 ± 58.07	36.89 ± 5.00	26.89 ± 2.04	4.3 ± 0.80
模型对照组($n=12$)	355.50 ± 33.09 *	266.33 ± 67.22 *	44.83 ± 4.76 *	24.9 ± 3.09 *
二甲双胍组($n=7$)	375.71 ± 31.41	111.44 ± 17.53 [△]	33.33 ± 3.06 [△]	6.8 ± 2.24 [△]
桑高剂量组($n=9$)	364.70 ± 67.41	170.00 ± 12.07 [△]	38.50 ± 8.16	18.9 ± 2.42 [△]
桑低剂量组($n=10$)	341.50 ± 50.57	226.38 ± 34.74	44.13 ± 3.07	22.9 ± 3.39

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

表 2 5 组 T2DM 大鼠糖耐量和胰岛素耐量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	血糖值(mmol/L)					AUC(mmol·h·L)
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
正常对照组($n=8$)	4.8 ± 0.71	8.4 ± 0.95	6.9 ± 1.53	5.0 ± 0.42	4.6 ± 0.39	10.02 ± 0.82
模型对照组($n=12$)	23.1 ± 0.99 *	32.2 ± 1.04 *	27.6 ± 3.26 *	27.1 ± 2.70 *	24.8 ± 1.05 *	43.79 ± 2.50 *
二甲双胍组($n=7$)	11.3 ± 3.57 [△]	16.0 ± 4.57 [△]	11.6 ± 5.73 [△]	8.6 ± 3.77 [△]	5.4 ± 2.28 [△]	22.09 ± 15.41 [△]
桑高剂量组($n=9$)	19.9 ± 5.11	30.2 ± 3.54	25.2 ± 1.90	22.5 ± 1.03 [△]	20.9 ± 1.66 [△]	39.65 ± 2.82 [△]
桑低剂量组($n=10$)	23.1 ± 1.86	32.5 ± 1.27	28.3 ± 2.11	25.0 ± 6.00	23.6 ± 2.07	44.46 ± 1.73

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

表3 5组 T2DM 大鼠 ITT 比较(第11周)($\bar{x} \pm s$)

组别	血糖(mmol/L)					AUC(mmol/h/L)
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
正常对照组($n=8$)	5.02 $\pm$ 0.34	1.38 $\pm$ 0.28	1.40 $\pm$ 0.50	1.25 $\pm$ 0.32	3.53 $\pm$ 1.52	6.53 $\pm$ 1.39
模型对照组($n=12$)	29.27 $\pm$ 4.31 *	19.18 $\pm$ 9.28 *	9.18 $\pm$ 9.41 *	6.63 $\pm$ 9.39 *	7.98 $\pm$ 7.90 *	34.42 $\pm$ 18.24 *
二甲双胍组($n=7$)	11.82 $\pm$ 3.97 Δ	8.82 $\pm$ 6.60	5.47 $\pm$ 7.49	3.35 $\pm$ 2.50	2.13 $\pm$ 0.77	13.60 $\pm$ 8.84 *
桑高剂量组($n=9$)	19.37 $\pm$ 1.81 Δ	11.85 $\pm$ 5.46	3.83 $\pm$ 2.51	2.77 $\pm$ 0.79	1.97 $\pm$ 0.71	18.10 $\pm$ 3.69 *
桑低剂量组($n=10$)	23.73 $\pm$ 2.43	13.27 $\pm$ 2.89	5.25 $\pm$ 2.92	2.25 $\pm$ 1.01	1.60 $\pm$ 0.36	15.61 $\pm$ 4.93

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

表4 5组 T2DM 大鼠胰岛素水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	胰岛素(g/L)	HOMA-IR(%)
正常对照组($n=8$)	29.33 $\pm$ 3.93	5.3 $\pm$ 1.12
模型对照组($n=12$)	66.70 $\pm$ 7.99 *	69.63 $\pm$ 9.51 *
二甲双胍组($n=7$)	42.90 $\pm$ 13.62 Δ	13.96 $\pm$ 9.32 Δ
桑高剂量组($n=9$)	63.35 $\pm$ 5.52	52.82 $\pm$ 10.82 Δ
桑低剂量组($n=10$)	65.17 $\pm$ 5.24	63.90 $\pm$ 13.52

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

2.4 5组 T2DM 大鼠血清炎症反应递质比较 与正常对照组比较,模型组血清中 IL-6、TNF-和 CRP 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍可以明显降低 IL-6、TNF-和 CRP 水平,差异有统计学意义($P<0.05$);桑叶组 IL-6 和 CRP 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),TNF-有一定的降低趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表5。

表5 5组 T2DM 大鼠血清炎症反应递质比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	IL-6	TNF-	CRP
正常对照组($n=8$)	17.70 $\pm$ 11.91	4.54 $\pm$ 1.23	72.05 $\pm$ 20.06
模型对照组($n=12$)	57.89 $\pm$ 25.79 Δ	8.69 $\pm$ 1.81 Δ	135.48 $\pm$ 17.03 Δ
二甲双胍组($n=7$)	26.04 $\pm$ 15.30 *	6.13 $\pm$ 1.46 *	95.20 $\pm$ 16.94 *
桑高剂量组($n=9$)	22.65 $\pm$ 9.27 *	7.69 $\pm$ 2.71	77.43 $\pm$ 16.60 Δ
桑低剂量组($n=10$)	30.07 $\pm$ 21.38 *	7.92 $\pm$ 2.75	83.94 $\pm$ 20.68 Δ

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

2.5 5组 T2DM 大鼠肝脏 TLRs 及其下游信号元件 mRNA 比较 与正常对照组比较,模型组 TLR7、TLR8、TLR9 及 TRAF-6、MyD88、核因子-B 表达量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍、桑叶高剂量可以明显降低 TLRs 受体及其下游信号蛋白的基因表达量,桑叶低剂量可以

明显降低 TLRs 受体及其下游信号蛋白的基因表达量,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表6。

3 讨论

T2DM 是以高胰岛素血症和胰岛素抵抗为特征的非传染性疾病。患者多有饮食不节,过食肥腻,好逸恶劳之恶习,中医学将之列入“消渴”的范畴,中医认为“消渴症”的病机为阴虚燥热或兼有痰湿血瘀证,治疗以益气养阴清热药为主,或配伍以化痰祛瘀药。桑叶味甘性寒,甘以养阴,寒以凉血,兼有清、润之效,临床常用于治疗阴虚内热型消渴^[21]。本实验通过观察桑叶对高脂饲料喂养联合 STZ 注射制备 T2DM 大鼠的治疗作用,发现桑叶可以有效降低大鼠空腹血糖值、饮水量,改善 T2DM 大鼠 OGTT 和 ITT,同时发现桑叶可以降低 HOMA-IR,说明桑叶可以改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗。

桑叶可以降低 T2DM 大鼠血清中 IL-6、TNF-、CRP 的水平,提示桑叶改善胰岛素抵抗,治疗 T2DM,可能是通过降低炎症反应水平来实现的。研究显示,相较于未患病者,T2DM 患者体内 IL-6、TNF-和 CRP 水平明显升高,说明 T2DM 患者体内存在炎症反应^[22]。有学者认为,T2DM 是机体非特异免疫产生的慢性炎症反应^[23]。炎症反应是机体应对外界刺激产生的防御机制,机体受到病毒、抗原等刺激时,免疫细胞被激活,可分泌 IL-6、TNF-和 CRP 来进行自我保护。IL-6 主要由脂肪组织分泌,肝脏也是其分泌的重要部位,正常生理状态下,IL-6 有利于肝糖代谢,T2DM 患者体内脂肪代谢紊乱,身体长期处于慢性炎症反应浸润状态下,长期过量分泌的

表6 5组 T2DM 大鼠肝脏 TLRs 及其下游信号元件 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	TLR7	TLR8	TLR9	TRAF-6	MyD88	NF-B
正常对照组($n=8$)	1.02 $\pm$ 0.15	0.98 $\pm$ 0.03	1.05 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.05
模型对照组($n=12$)	1.64 $\pm$ 0.27 *	1.84 $\pm$ 0.32 *	1.88 $\pm$ 0.32 *	1.74 $\pm$ 0.18 *	1.46 $\pm$ 0.37	1.76 $\pm$ 0.23
二甲双胍组($n=7$)	0.77 $\pm$ 0.26 Δ	1.01 $\pm$ 0.30 Δ	1.10 $\pm$ 0.26 Δ	0.83 $\pm$ 0.24 Δ	0.69 $\pm$ 0.21 Δ	0.78 $\pm$ 0.14 Δ
桑高剂量组($n=9$)	0.84 $\pm$ 0.21 Δ	1.44 $\pm$ 0.47 *	1.18 $\pm$ 0.22 Δ	0.78 $\pm$ 0.20 Δ	0.77 $\pm$ 0.18 Δ	0.92 $\pm$ 0.26 Δ
桑低剂量组($n=10$)	1.42 $\pm$ 0.34	0.91 $\pm$ 0.25 *	1.67 $\pm$ 0.39	1.09 $\pm$ 0.22 Δ	0.96 $\pm$ 0.37 *	0.87 $\pm$ 0.22 *

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

IL-6 可导致胰岛 B 细胞功能损伤,产生 IR^[24]。TNF-具有多种生物学活性,可以诱导 IL-6 等多种炎症反应递质的分泌,在 T2DM 过程中,可直接作用于胰岛 B 细胞,抑制胰岛素分泌或者通过抑制胰岛素受体信号和葡萄糖转运导致或者加重 IR^[25]。CRP 为非特异性免疫的炎症标志物,是预测 T2DM 发病的危险因子,其在 TNF-和 IL-6 等炎症反应递质的刺激下由肝脏产生分泌,可以通过抑制胰岛素受体酪氨酸激酶加重 IR^[26]。本实验中在前期实验研究基础上发现桑叶不仅可以降低糖尿病大鼠肝脏组织 TLRs 的表达,同时还可以下调其下游信号元件 TRAF-6、MyD88 以及核因子-B 的相对表达。

TLRs 介导的信号通路在炎症反应中具有重要作用,目前在哺乳动物体内共发现 13 个具有功能的 TLRs,其中 TLR1 ~ TLR9 为人鼠共有。TLRs 是 I 型跨膜蛋白,主要分为胞外域、跨膜区和胞内域 3 部分,胞外域因与白细胞介素-1 受体序列高度相似,被称作 Toll/IL-1 (TIR) 结构域,主要负责介导下游信号转导^[27]。TLRs 介导的信号途径主要为两类:一类是 MyD88 依赖性通路:MyD88 活化后与 IRAKs 结合,活化后的 IRAKs 与 TRAF6 磷酸化,并与 MyD88 解离。TRAF6 在与 Ubc13/Uevl A 催化下发生泛素化,泛素化后的 TRAF6 激活 TAK1,引起 IKK 复合物磷酸化,促使 I-B 磷酸化,并与核因子-B 解离,核因子-B 进入细胞核,激活炎症反应基因,诱使其表达。TLR5、TLR 7、TLR 8、TLR9 与配体识别后可以直接激活 MyD88,TLR2 和 TLR 在与 Mal 蛋白结合后再识别 MyD88^[28]。另一类是非 MyD88 依赖性通路,由 TLR3、TLR4、TLR5 激活^[29],间接促进核因子-B 的表达,刺激炎症反应递质分泌。本实验在前期研究基础上利用实时 PCR 技术对桑叶干预后糖尿病大鼠肝脏组织进行检测,其 TLR7、TLR 8、TLR9 以及其下游信号通路中 MyD88、TRAF6、核因子-B mRNA 表达,均出现了不同程度的下降,因此,桑叶可能是通过抑制 TLRs 及其下游信号元件表达,进而抑制炎症反应,发挥降糖作用。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 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):后插 2-后插 42.
- [2] 陆菊明. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病的发生发展[J]. 药品评价,2014,11(23):12-15,40.
- [3] Camara SN, Yin T, Yang M, et al. High Risk Factors of Pancreatic Carcinoma[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2016,36(3):295-304.
- [4] 聂绪强,张丹丹,张涵. 炎症、胰岛素抵抗与糖尿病的中药治疗[J]. 中国药理学杂志,2017,52(1):1-7.
- [5] 吴燕燕,王易. Toll 样受体信号通路中 MyD88 的研究进展[J]. 免

疫学杂志,2012,28(3):262-265.

- [6] 吴亚柳,常晓彤. 胰岛素信号通路、炎症信号通路与泛素-蛋白酶体系统的交互作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2016,32(11):1177-1184.
- [7] 栗明,丁常宏,方芳. 糖尿病中医治疗进展[J]. 中医药信息,2012,29(6):112-115.
- [8] 陈群,苏傲蕾,黄正团. 糖脉康颗粒对 2 型糖尿病气阴两虚夹瘀证大鼠 CRP 及脏器指数的影响[J]. 光明中医,2017,32(23):3393-3396.
- [9] 朱群. 降糖饮治疗 2 型糖尿病 60 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2011,9(14):36-37.
- [10] 刘兴忠. 中药桑叶治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[J]. 中国现代医生,2008,46(14):83-84.
- [11] 刘洪凤,韩智学,聂影,等. 桑叶多糖对糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(14):3959-3960.
- [12] 何美霞,常化静,海洋,等. 桑叶生物碱、黄酮及多糖对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):192-195.
- [13] 刘冬恋,凌保东,谭林,等. 桑叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 α 和腺苷酸活化蛋白激酶 α 2 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2017,37(22):5521-5523.
- [14] 李有贵,钟石,吕志强,等. 桑叶 1-脱氧野尻霉素 (DNJ) 对 α -蔗糖酶的抑制动力学研究[J]. 蚕业科学,2010,36(6):885-888.
- [15] 穆晓燕,李先佳. 桑叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):213-216.
- [16] Cai S, Sun W, Fan Y, et al. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats[J]. Pharm Biol,2016,54(11):2685-2691.
- [17] 常化静. 桑叶提取物通过 NF- κ B 信号通路改善 KKAy 小鼠胰岛素抵抗的机制研究[D]. 广州:南方医科大学,2015.
- [18] 赵保胜,高晓燕,刘洋,等. 桑叶治疗 2 型糖尿病药效及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):263-266.
- [19] 田思敏,柳辰玥,马双双,等. 桑叶对糖尿病小鼠肝脏 Toll 样受体基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):137-142.
- [20] 刘正霞,徐阳,徐进梅,等. 不同引物及数据分析方法对定量 PCR 结果的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(8):1112-1117.
- [21] 赖玲林,彭小芳,冷恩念,等. 中药桑叶药理作用的研究进展[J]. 安徽医药,2016,20(12):2210-2214.
- [22] 梁懿虹. 2 型糖尿病血糖与炎症因子相关性分析[J]. 实用妇科内分泌电子杂志,2017,4(27):83,86.
- [23] Ziegler D. Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder[J]. Curr Mol Med,2005,5(3):309-322.
- [24] 焦娟. 蛋白磷酸酶 4 在 IL-6 诱导的肝脏胰岛素抵抗中的作用机制研究[D]. 北京:北京协和医学院,2012.
- [25] Liu C, Feng X, Li Q, et al. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. Cytokine,2016,86:100-109.
- [26] Ghaffari MA, Askari SS, Rashtchizadeh N, et al. Association of CRP gene polymorphism with CRP levels and Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes in Ahvaz, southwest of Iran[J]. Bioimpacts,2014,4(3):133-139.
- [27] 王金兰,尹德领. 脊椎动物 Toll 样受体识别多样病原体机制研究[D]. 济南:山东大学,2016.
- [28] Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling[J]. F1000Prime Rep,2014,6:97.
- [29] Suet Ting Tan R, Lin B, et al. The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages. Immunol Cell Biol,2013,91(5):377-387.