

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.05.032

二甲双胍与白花丹参联合治疗 2 型糖尿病的研究

麻建平^{1,2}

(1. 浙江大学医学院附属二院建德分院, 建德 311600; 2. 浙江省建德市第一人民医院, 建德 311600)

摘要: 为了探究二甲双胍与白花丹参浸出液联用对 2 型糖尿病的治疗作用, 本文采用 MTT 法检测联合用药对 INS-1 细胞凋亡的抑制作用, 并采用糖尿病大鼠模型研究联合用药对血糖和胰岛素释放的影响. 结果表明, 二甲双胍与白花丹参联用具有抗 INS-1 细胞凋亡的作用. 在糖尿病大鼠治疗过程中, 检测血糖和胰岛素含量可知二甲双胍与白花丹参联用能有效控制血糖, 效果比单独使用二甲双胍明显. HE 染色也显示联合用药能抑制胰岛细胞凋亡, 且比二甲双胍或白花丹参单独使用的效果好. 免疫组化染色中, 与糖尿病对照组和二甲双胍组相比, 联合用药组的 Bcl-2 蛋白量增加, Bax 蛋白量减少. 二甲双胍与白花丹参联用具有抑制胰岛 B 细胞凋亡, 增加胰岛素释放的作用, 同时促进血糖摄取和利用, 能起到很好的降血糖作用. 白花丹参作为治疗糖尿病的辅助药物能有效提高二甲双胍的治疗效率.

关键词: 二甲双胍; 白花丹参; 糖尿病; 胰岛 B 细胞; 抑制凋亡

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)05-1116-05

Combined utilization of metformin and *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba on diabetes mellitus

MA Jian-Ping^{1,2}

(1. The Second Affiliated Hospital Jiande Branch, School of Medicine, Zhejiang University, Jiande 311600, China;
2. The First People's Hospital of Jiande, Jiande 311600, China)

Abstract: In order to observe the combined utilization effect of metformin and *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba on diabetes mellitus type 2, MTT method, glycemic and insulintest, hematoxylin eosin (HE) staining and immunohistochemical staining were carried out in this paper. MTT test results show that combined utilization of metformin and *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba can inhibit the apoptosis of INS-1 cells. In the treatment of diabetic rats, combined utilization appears to effectively control to blood sugar. HE staining and immunohistochemical staining results show that *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba can promote the production of Bcl-2 proteins, weaken the ability of Bax proteins to induce apoptosis, in the mean time, metformin has the effect on increasing blood sugar uptake and utilization, ultimately achieve glycemic control purposes. Combined utilization of metformin and *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba has the potential to be an effective method to the treatment of diabetes.

Keywords: Metformin; *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba; Diabetes; Islet B cells; Inhibition of apoptosis

1 引言

近年来, 因为肥胖、高热量饮食、缺乏运动等

不良的生活方式和遗传因素引起的 2 型糖尿病的患病率不断增加^[1]. 二甲双胍作为 2 型糖尿病治疗领域最为经典的降糖药物之一, 自上世纪 50 年

收稿日期: 2017-08-27

基金项目: 浙江省医学会临床医学基金(2015ZYC-A45)

作者简介: 麻建平(1984-), 男, 主治医师, 主要研究方向为急症处理和糖尿病研究. E-mail: majianping121@outlook.com

代进入临床以来,凭借其有效性和安全性,在临床上应用广泛^[2,3]。二甲双胍是通过直接抑制肝脏的糖异生降低空腹血糖、通过提高外周组织(肌肉、脂肪)对葡萄糖的摄取和利用降低餐后血糖^[4,5]。国内外糖尿病指南均建议无论患者超重与否,除非有肾损害或肌酐清除异常的证据或风险,否则均应从开始就使用二甲双胍治疗,且联合治疗的方案中都应包括二甲双胍。但大量使用二甲双胍会引起乳酸性酸中毒、消化道不适、肝、肾损伤、加重酮症酸中毒等副反应。如何减少不良反应发生,提高治疗效率,是亟待解决的问题。

细胞凋亡是导致胰岛B细胞功能障碍的关键因素,而胰岛B细胞功能障碍是导致胰岛素分泌不足的主要原因^[6,7]。抑制胰岛B细胞的凋亡是治疗2型糖尿病的途径之一。现代检测发现,白花丹参含有丹参酮II-A、隐丹参酮、丹参酮I、丹参新酮、柳杉酚、丹参醇、 β -谷甾醇、胡萝卜苷^[8],具有丹参的药理作用,但其有效成分是紫花丹参的2-3倍,更含有紫花丹参不具有的成分,有很高的药用价值。有研究证明白花丹参水提物能使血液内丙二醛(MDA)及活性氧(ROS)不同程度下降,提高血液内超氧化物歧化酶(SOD)的活性,且在一定程度上能抑制胰岛B细胞的凋亡^[9]。

为了探究二甲双胍与白花丹参浸出液联合使用对2型糖尿病的治疗作用,本研究在INS-1细胞和Wistar/Slac大鼠模型上开展实验。

2 材料和方法

2.1 试剂及仪器

二甲双胍(北京天安制药股份有限公司),干燥白花丹参(莱芜紫光生态园有限公司),链脲佐菌素(STZ)(Sigma公司),大鼠胰岛素(INS)酶联免疫检测试剂盒(上海信帆生物科技有限公司),抗Bcl-2抗体(Apoptosis regulator Bcl-2)和抗Bax抗体(Apoptosis regulator BAX)(武汉博士德生物工程技术有限公司),大鼠胰岛B细胞INS-1细胞(上海酶联生物科技有限公司)。

罗氏血糖仪(德国罗氏诊断有限公司,型号Accu-Chek® Softclix),酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号Multiskan MK3),自动凝胶分析仪(上海培清科技有限公司,型号JS-380)。

2.2 实验方法

2.2.1 制备白花丹参浸出液 取干燥的白花丹参生药100g,切成小片,加入200mL水浸泡12h,接着加热煮沸30min,趁热过滤,得到第一道滤液。再将滤渣加水100mL,加热煮沸,趁热过滤

去除滤渣,得到第二道滤液,两道滤液合并。然后将滤液蒸馏浓缩至100mL,得到生药浓度为1g/mL的白花丹参浸出液,保存于4℃备用。

2.2.2 二甲双胍与白花丹参联用对INS-1细胞凋亡的抑制作用 STZ是一种由链球菌产生的,对哺乳动物胰脏中产生胰岛素的胰岛B细胞有着特异毒性的天然化合物,常被用于制造大鼠2型糖尿病模型,此外也有研究证明,STZ也可在体外诱导胰岛B细胞发生损伤^[10-15]。实验用STZ与INS-1细胞共孵育,诱导细胞损伤凋亡。

INS-1细胞用胰酶消化后以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中,在5%CO₂、37℃条件下培养12h,部分细胞用1mg/mL的STZ共孵育12h,部分细胞正常培养12h。将INS-1细胞分为7组:空白组、STZ组、二甲双胍组、白花丹参组、STZ+二甲双胍组、STZ+白花丹参组和STZ+二甲双胍+白花丹参组。空白组、二甲双胍组和白花丹参组,采用正常培养的细胞,去除旧培养基进行实验;STZ组、STZ+二甲双胍组、STZ+白花丹参组和STZ+二甲双胍+白花丹参组,采用STZ共孵育的细胞,去除含有STZ的培养基进行实验。空白组,加入新鲜培养基。STZ组,加入新鲜培养基。二甲双胍组和STZ+二甲双胍组,分别加入二甲双胍浓度为0.2mg/mL的培养基。白花丹参组和STZ+白花丹参组,将制备好的白花丹参浸出液用0.22 μ m的过滤头过滤,用培养基稀释到生药浓度为0.5g/mL,分别与细胞共孵育。STZ+二甲双胍+白花丹参组,加入含有二甲双胍0.2mg/mL和白花丹参生药浓度0.5g/mL的培养基。7组细胞孵育24h或48h后进行MTT检测,用酶标仪检测OD值。

2.2.3 建立糖尿病大鼠模型 雄性Wistar/Slac大鼠常规饲养3d后,禁食不禁水12h,按照55mg/kg STZ的剂量对大鼠进行腹腔注射。5d后随机取3次大鼠尾尖第二滴血测血糖,若测定大鼠血糖水平都大于16.7mmol/L,则造模成功。

2.2.4 二甲双胍与白花丹参联用对糖尿病大鼠的血糖和胰岛素含量的影响 取健康大鼠和糖尿病大鼠进行分组,共分成5组,每组6只,以二甲双胍作为阳性对照^[16]。空白对照组:健康大鼠,用等量生理盐水灌胃。糖尿病对照组:糖尿病大鼠,用等量生理盐水灌胃。二甲双胍组:糖尿病大鼠,用剂量为125mg/kg的二甲双胍灌胃。白花丹参组:糖尿病大鼠,用剂量为10g/kg的白花丹参浸出液灌胃。二甲双胍+白花丹参组:糖尿病大鼠,用剂量为125mg/kg的二甲双胍和剂量为10g/kg

的白花丹参浸出液灌胃。

将 5 组大鼠按分组进行连续灌胃给药 7 天, 期间观察各组的行为表现, 并测体重, 在最后一次灌胃后 30 min、60 min、120 min 分别进行大鼠尾尖取血, 取血 0.5 mL, 以 3000 r/min 离心 10min 取得血清, 分别检测胰岛素和血糖值^[17-19]。

2.2.5 苏木精-伊红(HE)染色 将检测血糖和胰岛素所用的大鼠麻醉, 解剖后取大小约 $1.0 \times 1.0 \text{ cm}^2$ 的胰岛组织, 生理盐水冲洗, 用 10% 福尔马林浸泡固定 24 h, 用常规方法进行石蜡包埋, 然后切片进行 HE 染色。

2.2.6 免疫组化检验 取上述石蜡切片进行免疫组化染色, 采用免疫组化 SP 法染色, DAB 显色, 其中一抗采用 Bax 抗体或 Bcl-2 抗体 (1:100 稀释), 二抗采用生物素化山羊抗兔 IgG。晾干封片后用自动凝胶分析仪观察, 并随机选择 5 个视野进行拍照, 用平均光密度表示蛋白表达的相对含量^[20]。

2.2.7 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 二甲双胍与白花丹参联用对 INS-1 细胞凋亡的抑制作用

为了考察二甲双胍与白花丹参联用对正常细

胞的影响和对胰岛 B 细胞凋亡的抑制作用, 设置 7 组实验, 采用 MTT 法得到的 OD 值评价 INS-1 细胞受影响的程度, 结果如图 1。图 1(A) 中可见, 二甲双胍和白花丹参分别与正常 INS-1 细胞共孵育 24 h 和 48 h 时, 二甲双胍组和白花丹参组与空白组的 OD 值差别不大, 而 STZ 组的 OD 值则明显小于空白组。由此可知, 二甲双胍和白花丹参浸出液对正常细胞没有明显毒副作用, 而经过 STZ 处理的 INS-1 细胞受到损伤, 细胞活力不如正常细胞。图 1(B) 中可见, 二甲双胍、白花丹参和二甲双胍+白花丹参分别与受到损伤的 INS-1 细胞共孵育, 孵育 24 h 时, STZ+二甲双胍组的 OD 值与 STZ 组相差不大, STZ+白花丹参组的 OD 值略大于 STZ 组。同时, STZ+二甲双胍+白花丹参组的 OD 值略大于 STZ 组, 且与 STZ+白花丹参组的 OD 值相差不大。孵育 48 h 时, STZ+白花丹参组的 OD 值明显大于 STZ 组。此时, STZ+二甲双胍+白花丹参组的 OD 值明显大于 STZ 组, 且比 STZ+白花丹参组的 OD 值略大。由此可知, 用白花丹参浸出液孵育 STZ 处理的损伤细胞能增加细胞活力, 二甲双胍与白花丹参联用增加细胞的效果更好, 二甲双胍与白花丹参联用能有效抗 INS-1 细胞凋亡。

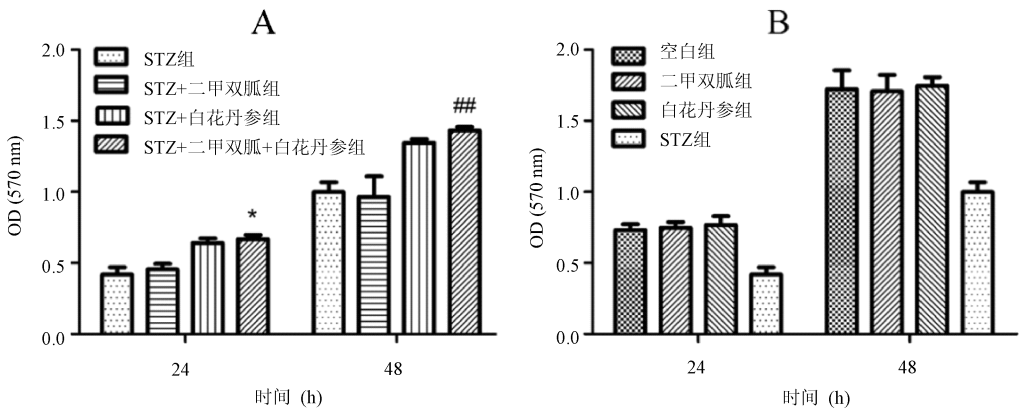


图 1 MTT 法检测。

(A) 二甲双胍、白花丹参和 STZ 对正常 INS-1 细胞的影响。(B) 二甲双胍、白花丹参和二甲双胍+白花丹参对有损伤 INS-1 细胞的影响, 与 24 h 的 STZ 组比较 * $P < 0.05$, 与 48 h 的 STZ 组比较 ## $P < 0.01$

Fig. 1 Detection of anti-apoptosis effect by MTT

(A) The effect of metformin, *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba and STZ on normal INS-1 cell. (B) The effect of metformin, *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba and Metformin+ *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba on injured INS-1 cell. * $P < 0.05$, significantly higher than that of 24 h STZ group; ## $P < 0.01$, significantly higher than that of 48 h STZ group

3.2 二甲双胍与白花丹参联用对糖尿病大鼠的血糖和胰岛素含量的影响

在实验期间, 空白对照组的饮食和行为均无异常; 糖尿病对照组、二甲双胍组、白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组均表现出多饮、多尿、多食,

毛发干燥, 体重降低, 活动量减小。二甲双胍组、白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组的活动量比空白对照组少, 但比糖尿病对照组多。实验期间测得的体重见表 1, 测试各组血糖和胰岛素结果见表 2。由表 2 可见, 与糖尿病组相比, 二甲双胍组、

白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组的糖尿病大鼠血糖都有所下降，其中二甲双胍+白花丹参组的血糖下降最明显。分析胰岛素分泌的数据，糖尿病对照组、二甲双胍组、白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组分泌的胰岛素都少于空白对照组，而白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组分泌的胰岛素量略大于糖尿病组和二甲双胍组，白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组分泌的胰岛素量相差不明显。综合血糖分析和胰岛素分析，可知白花丹参可提高胰岛素分泌量，二甲双胍与白花丹参

联用后降血糖的效果优于单独使用二甲双胍或白花丹参进行治疗。

表 1 各组大鼠的体重变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.1 Body weight of 5 groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	给药前体重	用药 7 天后体重
空白对照组	247±7.21	320±8.62
糖尿病对照组	250±6.35	174±7.44
二甲双胍组	252±7.13	202±8.38
白花丹参组	248±4.15	197±7.86
二甲双胍+白花丹参组	249±5.83	221±9.27

表 2 各组大鼠的血糖和胰岛素值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.2 Blood glucose and insulin values of 5 groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	血糖(mmol/L)			胰岛素(mIU/L)		
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
空白对照组	7.5±0.64	7.2±0.86	8.3±1.25	14.2±2.89	14.8±1.01	12.6±0.63
糖尿病对照组	18.4±1.32	18.0±0.42	17.4±3.51	7.3±1.03	7.8±0.98	7.7±0.83
二甲双胍组	9.8±1.61	10.2±2.13	10.6±0.89	7.9±2.44	8.0±2.88	7.0±1.65
白花丹参组	11.9±1.41	11.4±1.04	10.6±1.93	9.2±0.78	10.2±0.74	9.3±1.36
二甲双胍+白花丹参组	8.4±1.27	8.8±1.77	9.9±0.63	9.5±1.21	9.8±1.12	10.1±0.92

3.3 HE 染色

通过 HE 染色观察各组大鼠胰岛细胞的凋亡情况，见图 2。HE 染色结果显示，糖尿病对照组

(B)、二甲双胍组(C)、白花丹参组(D)和二甲双胍+白花丹参组(E)均存在不同程度的凋亡，白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组的凋亡情况较轻。

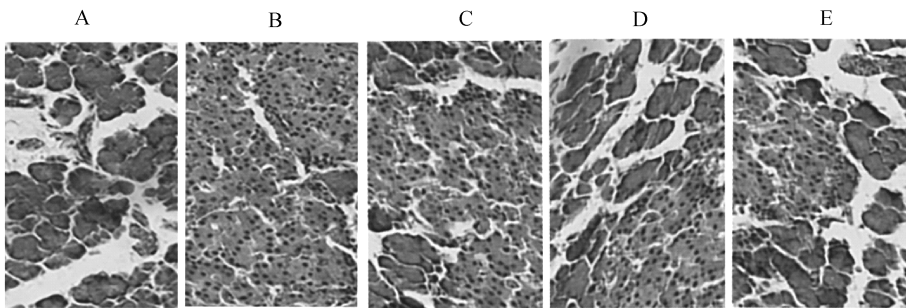


图 2 大鼠胰腺 HE 染色

A 为空白对照组；B 为糖尿病对照组；C 为二甲双胍组；D 为白花丹参组；E 为二甲双胍+白花丹参组

Fig.2 HEstained dissected rat pancreas

A: Control group; B: Diabetesgroup; C: Metformingroup; D: *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba; E: Metformin+ *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba.

3.4 免疫组化检验

Bcl-2 蛋白可拮抗氧化途径抑制细胞凋亡，Bax 蛋白则促进凋亡，检测这两种蛋白在胰腺中的含量有助于分析二甲双胍与白花丹参联用对胰岛 B 细胞凋亡的影响，结果见表 3。在白花丹参组和二甲双胍+白花丹参组实验大鼠胰岛组织中发现 Bcl-2 蛋白比糖尿病对照组和二甲双胍组的多，且在其组织中发现 Bax 量较糖尿病对照组少。由免疫组化实验证明，白花丹参能促进 Bcl-2 蛋白的产生，Bcl-2 与 Bax 结合产生 Bcl-2-Bax 异源二聚体，削弱了 Bax 蛋白促进凋亡的能力，抑制了胰

岛 B 细胞的凋亡，而二甲双胍促进了组织细胞对糖的摄取和利用，从而使二甲双胍和白花丹参联用的降血糖作用优于单独使用二甲双胍。

表 3 二甲双胍与白花丹参联用对胰岛 B 细胞的相关凋亡蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.3 Effects of metformin+ *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba on apoptosis related proteins of islet B cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	D _{Bax}	D _{Bcl-2}
空白对照组	0.87±0.06	1.28±0.02
糖尿病对照组	1.12±0.08	0.89±0.09
二甲双胍组	1.04±0.07	0.99±0.05
白花丹参组	0.90±0.03	1.18±0.05
二甲双胍+白花丹参组	0.89±0.05	1.15±0.04

4 结 论

本文通过细胞和动物实验研究联合用药对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞凋亡的影响,并探究其影响机制. INS-1 细胞的 MTT 实验结果显示,白花丹参在一定程度上具有抗 INS-1 细胞凋亡的作用,联合用药对正常细胞没有明显毒副作用. 进一步建立糖尿病大鼠模型并检测大鼠使用二甲双胍与白花丹参联合治疗后的血糖和胰岛素含量,发现白花丹参具有一定的促进胰岛素分泌的作用,与二甲双胍联用后降血糖的效果优于单独使用二甲双胍或白花丹参进行治疗. 对大鼠胰腺切片的免疫组化染色和 HE 染色实验证明,二甲双胍与白花丹参能进一步提高 Bcl-2 蛋白表达量,使 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白结合,从而抑制胰岛 B 细胞凋亡,由此促进胰岛素分泌,增加组织细胞对血糖的摄取和利用,使血糖降低. 二甲双胍与白花丹参联合治疗能改善治疗效果,白花丹参对抑制胰岛 B 细胞凋亡并促进胰岛素分泌有积极作用,有潜力开发为治疗糖尿病的辅助药物.

参考文献:

[1] Shaw J, Sicree R, Zimmet P. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2010, 87 (1): 4.

[2] Hundal R, Inzucchi D. Metformin [J]. *Drugs*, 2003, 63: 1879.

[3] Kahn S E, Haffner S M, Heise M A, *et al.* Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy [J]. *New Engl J Med*, 2006, 355: 2427.

[4] Foretz M, H ebrard S, Leclerc J, *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AM PK pathway via a decrease in hepatic energy state [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2355.

[5] Sarabia V, Lam L, Burdett E, *et al.* Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90: 1386.

[6] 杨庆宇, 郜娜. 利拉鲁肽通过调节 microRNA-375 对胰岛细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32: 1627.

[7] Lorenzo C, Wagenknecht L E, D'Agostino R B Jr, *et al.* Insulin resistance, beta-cell dysfunction, and conversion to type 2 diabetes in a multiethnic population: the insulin resistance atherosclerosis study [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33: 67.

[8] 曹春泉, 孙隆儒, 娄红祥, 等. 白花丹参的化学成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20: 636.

[9] 李广红, 郭征东, 李菁, 等. 白花丹参水提物对糖尿病大鼠心肌组织氧化应激的影响 [J]. *泰山医学院学报*, 2015, 36: 848.

[10] 张雪, 邢宝恒, 曹亚磊, 等. 白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠肾脏组织抗氧化和抗炎的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23: 131.

[11] 范愈燕, 吕翠岩, 朱斌, 等. 黄芪甲苷对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠肾保护机制探讨 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30: 1054.

[12] 杨丽, 徐利满, 朱晓丹, 等. 金芪降糖片对糖尿病引发的认知功能障碍的影响及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23: 146.

[13] 王伟, 尚佳, 廖国玲, 等. 枸杞总黄酮提取物对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37: 17.

[14] Li Y, Ji D, Zhong S, *et al.* Cooperative anti-diabetic effects of deoxynojirimycin-polysaccharide by inhibiting glucose absorption and modulating glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Plos One*, 2013, 8: e65892.

[15] Lei H, Wang Q, Guo S, *et al.* The protective effect of MT- α -glucan against streptozotocin (STZ)-induced NIT-1 pancreatic β -cell damage [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92: 1211.

[16] 陈玉华, 武革, 郭中秋, 等. 二甲双胍对大鼠 2 型糖尿病并发非酒精性脂肪肝治疗作用的实验研究 [J]. *中国医师杂志*, 2011, 13: 1014.

[17] 李志田, 杨保津, 马广恩. 白花丹参化学成分的研究 [J]. *药学学报*, 1991, 26: 209.

[18] 高允生, 姜隆梅, 刘延平, 等. 白花丹参茎叶水提物对小鼠缺氧作用的研究 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9: 115.

[19] 王贤军, 夏青, 蔡洪信, 等. 白花丹参叶制剂对局灶性脑梗死 HSP70 及细胞凋亡的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3: 140.

[20] 章毓晋. 图像处理和分析基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 103.

引用本文格式:

中 文: 麻建平. 二甲双胍与白花丹参联合治疗 2 型糖尿病的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1116.

英 文: Ma J P. Combined utilization of metformin and *Salvia miltiorrhiza* bge. f. *alba* on diabetes mellitus [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1116.