

黄金胶囊对 2 型糖尿病伴胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞 PI-3K、GLUT4 蛋白表达的影响

康学东¹, 张瀚文², 余臣祖²

1. 甘肃中医药大学附属医院内分泌科, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 观察黄金胶囊对糖尿病大鼠骨骼肌细胞磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、葡萄糖转运因子 4 (GLUT4) 表达的影响, 探讨其改善胰岛素抵抗的作用机制。方法: 采用小剂量链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射加高热量饲料喂养, 制备 2 型糖尿病 (T2DM) 伴胰岛素抵抗 (IR) 大鼠模型, 通过免疫组化法观察黄金胶囊对糖尿病各组大鼠体重、血糖及骨骼肌细胞 PI-3K 和 GLUT4 蛋白表达的影响。结果: 黄金胶囊组大鼠较模型组体重减轻, 血糖降低, 骨骼肌细胞 PI-3K 和 GLUT4 的蛋白表达提高, 作用与罗格列酮组相当。结论: 黄金胶囊改善 T2DM 伴 IR 大鼠体重、降低血糖机制可能与提高骨骼肌细胞 PI-3K 和 GLUT4 的蛋白表达有关。

[关键词] 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 黄金胶囊; 罗格列酮

[中图分类号] R587.1 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 12-0227-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.12.102

在 2 型糖尿病的发生、发展过程中胰岛素抵抗作为重要的发病因素与其有着密切的联系。随着现代医学的发展, 近年来研究中医药对胰岛素抵抗的干预有了一定的进展。其中尤以黄连的研究最多, 其主要成分中小檗碱含量最高, 研究发现其具有一定的降血糖作用。同时鸡内金的有效成分鸡内金多糖也同样具有降低血糖、血脂的作用。本课题的前期研究证明, 黄金胶囊在大剂量治疗 2 型糖尿病大鼠时具有明显改善胰岛素抵抗的作用, 本研究在前期研究的基础上, 进一步研究黄金胶囊改善胰岛素抵抗的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及处理 选用 4 月龄、雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 体重 200~250 g, 由甘肃中医学院动物实验中心 SPF 级实验室提供 [实验动物质量合格证号: SCXK(甘)2011-0001-0001365, 动物实验设施使用证号: SYXK(甘)2011-0001-0000407]。Wistar 大鼠用普通饲料适应性喂养 4 周后, 按体重编号, 查随机数字表抽取 10 只大鼠为空白组 (喂以普通饲料); 其余 50 只为造模组, 均喂以高脂饲料, 高脂饲料参考 Leng S 等^[1]稍作修改 (其中含胆固醇 2%, 猪油 10%, 基础饲料 88%), 造模组喂养 4 周后, 禁食 12 h, 将链脲佐菌素 (STZ) 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH=4.4) 中, 按剂量 50 mg/kg 一次性左下腹腔注射, 72 h 后禁食、不禁水 12 h, 尾静脉采血, 测量大鼠尾静脉空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (OGTT2h), 取 FPG ≥ 11.0 mmol/L、OGTT2h ≥ 16.7 mmol/L

的大鼠归入糖尿病模型组。将造模成功大鼠随机分为模型组、罗格列酮组、金胶囊组, 各组动物分别灌胃药物或生理盐水 (NS), 每天 1 次, 给药剂量按人与大鼠体表面积折算成等效剂量。空白组、模型组分别每天灌胃等剂量的 NS (1 mL/kg); 罗格列酮组每天灌胃罗格列酮溶液 (0.36 mg/kg); 黄金胶囊组每天灌胃等体积黄金胶囊溶液 (2.025 g/kg)。除空白组外, 其余各组均继续喂以高脂饲料 10 周, 并每周称体重。

1.2 试剂与药物 链脲佐菌素 (STZ) [Sigma 公司 (美国), 产品批号: S0130-1G]; 罗格列酮 (太极集团重庆涪陵制药有限公司生产, 批号: 13010006, 规格: 4 mg); 黄金胶囊 (由甘肃中医学院附属医院制剂中心提供, 批号: 1201101); 瑞特血糖监测系统 和 试纸条 [厂家: 华广生技股份有限公司, 注册号: 国食药监械(许)字 2012 第 2400103 号]; 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: 11CM 251), 葡萄糖转运因子 4 (GLUT4) 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BA 1353-1), 一抗山羊抗兔免疫组化试剂盒 (先北京中衫金桥生物技术有限公司, 批号: 14188A05)。

1.3 检测方法 喂养 10 周后尾静脉取血, 采用瑞特血糖监测仪和试纸条测定血糖。取大鼠一侧后肢骨骼肌, 大小约 2 mm × 15 mm × 10 mm, 放于实验前编号的广口瓶中, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定, 24 h 后送病理实验室, 常规石蜡包埋、切片 (5 μm), 行免疫组化染色, 用 BI-2000 医学图像分析

[收稿日期] 2015-03-30

[基金项目] 甘肃省科技厅科技计划项目 (1208RJZA179); 甘肃中医药大学中青年科研基金项目 (ZQ2014-12)

[作者简介] 康学东 (1962-), 男, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗糖尿病及其并发症。

[通讯作者] 余臣祖, E-mail: 442940743@qq.com。

系统分析图像，测定 PI3K，GLUT4 平均光密度。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理，计数资料以($\bar{x} \pm s$)表示，组间均数比较采用单因素方差分析及配对 T 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠体重变化比较 见表 1。模型组给药后体重与黄金胶囊组比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重变化比较($\bar{x} \pm s$) g

组别	样本数	给药前	给药后
空白组	12	247.7± 22.83	320.8± 18.12
模型组	12	253.5± 25.50	418.9± 18.90
罗格列酮组	12	248.6± 19.85	368.1± 17.29
黄金胶囊组	12	250.7± 24.53	289.8± 15.55 ^①

与模型组相比较，^① $P < 0.05$

2.2 各组大鼠 FPG 变化比较 见表 2。大鼠经造模后空白组与其余各组 FPG 比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)，经过药物干预后，模型组 FPG 与其他用药组比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，各药物组均治疗有效。

表 2 各组大鼠 FPG 变化比较($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	样本数	剂量(mg/kg)	给药前	给药后
空白组	12	等体积 NS	4.52± 0.48	4.48± 0.51
模型组	12	等体积 NS	21.54± 2.88 ^①	26.47± 1.23
罗格列酮组	12	0.5	22.45± 3.67 ^①	12.67± 0.87 ^②
黄金胶囊组	12	20.25	22.68± 3.42 ^①	13.36± 1.01 ^②

与空白组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠 OGTT2h 变化比较 见表 3。大鼠经造模后空白组与其余各组 OGTT2h 比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)，经过药物干预后，模型组 OGTT2h 与其他用药组比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，各药物组均治疗有效。

表 3 各组大鼠 OGTT2h 变化比较($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	样本数	剂量(mg/kg)	用药前	用药后
空白组	12	等体积 NS	4.63± 0.46	6.94± 0.62
模型组	12	等体积 NS	21.54± 2.88 ^①	25.98± 3.25
罗格列酮组	12	0.5	22.45± 3.67 ^①	12.85± 0.67 ^②
黄金胶囊组	12	20.25	22.68± 3.42 ^①	16.51± 1.09 ^②

与空白组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠骨骼肌组织 PI3K、GLUT4 蛋白表达比较 见表 4、表 5、图 1、图 2。免疫组化染色后的空白组正常骨骼肌组织中棕色区域提示 PI3K 阳性，棕色染色均匀分布在细胞质及细胞膜上，表达蛋白染色呈深棕色，呈点状，细胞核内阳性染色不明显。模型组中目标蛋白主要分布在细胞膜及细胞质内，阳性染色颗粒数量减少，分布不均匀，颜色呈浅黄色，说明目

标蛋白表达明显减弱，相同视野内阳性显色面积较正常骨骼肌组织明显减少。罗格列酮组阳性表达位置不变，相同视野内阳性显色细胞分布不均匀，阳性表达较低于空白组，高于模型组。黄金胶囊组阳性表达特点同罗格列酮组，但阳性表达细胞数量及表达强度低于罗格列酮组，高于模型组。通过切片图像学分析：空白组 PI3K、GLUT4 蛋白表达与其他各组比较，蛋白表达最强最明显($P < 0.05$)，模型则呈现低表达，表达强度低于罗格列酮组及黄金胶囊组($P < 0.05$)，罗格列酮组与黄金胶囊组比较，前者表达强度更强($P < 0.05$)。

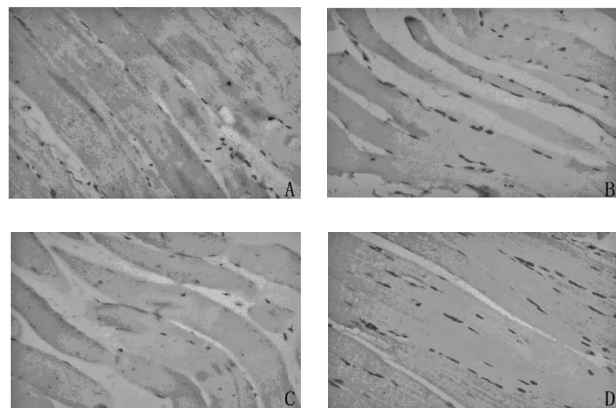


图 1 各组大鼠 PI3K 蛋白免疫组化图 (空白组为 A，模型组为 B，罗格列酮组为 C，黄金胶囊组为 D)

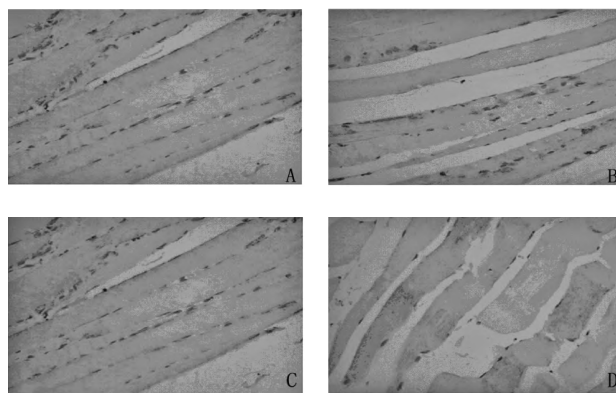


图 2 各组大鼠 GLUT4 蛋白免疫组化图 (空白组为 A，模型组为 B，罗格列酮组为 C，黄金胶囊组为 D)

表 4 各组大鼠骨骼肌组织 PI3K 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	平均光密度
空白组	12	0.381± 0.012
模型组	12	0.310± 0.008 ^①
罗格列酮组	12	0.370± 0.041 ^{①②}
黄金胶囊组	12	0.353± 0.006 ^{①②③}

与空白组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$ ；与罗格列酮组比较，^③ $P < 0.05$

表 5 各组大鼠骨骼肌组织 GLUT4 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	平均光密度
空白组	12	0.378± 0.009
模型组	12	0.309± 0.007 ^①
罗格列酮组	12	0.364± 0.006 ^{①②}
黄金胶囊组	12	0.351± 0.010 ^{①②③}

与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与罗格列酮组比较, ③ $P < 0.05$

3 讨论

向雪松^[2]比较了不同实验所用的高脂饲料的构成, 指出动物饲料组成猪油占 10%、蔗糖占 20% 这样的配比, 易于诱发胰岛素抵抗、造模成功率较高且能使血糖中度升高, 是较好的复制 2 型糖尿病模型的高脂饲料的选择。本研究采用的高脂饲料配比方案来自于模拟 2 型糖尿病患者的饮食模式进行的高脂饲料的分配比, 其中胆固醇及胆酸盐的添加, 无疑是本研究的亮点所在。

现代医学认为, 胰岛素通过信号转导调节糖代谢和能量代谢。其中 PI3K 途径被认为是胰岛素信号转导的经典途径^[3], PI3K 途径是胰岛素在靶器官中信号转导的主要通路之一, 胰岛素作用的靶器官, 在摄取利用葡萄糖时, 是经由一步一步蛋白结合, 信号激活所传导下去的。即从胰岛素受体到胰岛素受体底物-1, 再到 PI3K 最后传递至 GLUT4 等一系列的信号转导过程完成的^[4]。这一信号转导过程的任何环节障碍均可引起胰岛素抵抗。

目前, 许多动物实验和临床研究表明, 黄连及其有效成分生物碱对于改善糖尿病及其并发症的各种症状具有明显效果, 但其作用机制尚未完全阐明。现今对黄连的研究表明, 黄连中的主要成分为小檗碱, 研究表明小檗碱可以改善胰岛素抵抗、刺激胰岛素分泌, 及降低血脂^[5]。小檗碱可以增加肝脏中过氧化物酶增殖体激活受体, 同时可上调肝脏胰岛素诱导基因^[6]。有研究表明, 黄连中所含的生物碱可提高大鼠骨骼肌糖原储备, 增加糖尿病大鼠胰岛素底物、GLUT4, 从而起到降低血糖的作用^[7]。现代对鸡内金的研究表明, 鸡内金内含有鸡内金多糖, 其可提高糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠的脾脏指数和胸腺指数, 促进淋巴细胞转化, 改善其细胞免疫功能, 依据对给予鸡内金多糖大鼠的跟踪研究表明, 鸡内金多糖可降低空腹血糖水平, 同时对血脂有一定的调节作用。在黄金胶囊改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性研究中, 黄金胶囊可以提高胰岛素敏感指数^[8]。

2 型糖尿病多系特异性体质人群长期饮食失常(如过食肥

甘厚味等)与体力活动减少等共同作用致使人体气化失常、浊毒积聚, 进而阻碍气血运行, 影响脏腑功能所致, 中医治疗 2 型糖尿病伴胰岛素抵抗从毒浊论治, 解毒化浊、调气活血。本实验所用的黄金胶囊, 药物组成为黄连、鸡内金。黄连苦寒, 清热燥湿, 泻火解毒。长期应用损伤脾胃, 故佐以鸡内金运脾消食, 护胃和中, 二药合用, 共奏解毒化浊、调气活血之效。

本实验研究表明, 黄金胶囊可降低血糖、体重, 增加骨骼肌细胞 PI3K 和 GLUT4 蛋白表达, 效应基本与罗格列酮一致, 推测黄金胶囊提高胰岛素敏感性的作用, 与激活骨骼肌组织胰岛素信号传导通路中 PI3K 和 GLUT4 的蛋白表达有关。

[参考文献]

- [1] Leng S, Lu FE, Xu L. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, 25(4): 496-502.
- [2] 向雪松. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其在辅助降血糖功能评价中的应用[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010.
- [3] Taha C, Klip A. The insulin signaling pathway [J]. Journal of Membrane Biology, 1999, 169(1): 1-12.
- [4] Wojtaszewski JFP, Hansen BF, Kiens B, et al. Insulin signaling in human skeletal muscle: time course and effect of exercise [J]. Diabetes, 1997, 46(11): 1775-1781.
- [5] Liu WH, Hei ZQ, Nie H, et al. Berberine ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by suppression of both oxidative stress reductase [J]. Endocrinology, 2008, 149(9): 4510.
- [6] Zhou JY, Zhou SW, Zhang KB, et al. Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 1169.
- [7] 徐颖. 黄连总生物碱的提取及其对实验性糖尿病肾病大鼠的保护作用及机制的初步研究[D]. 重庆: 第三军医大学博士学位论文, 2006: 36.
- [8] 崔庆荣. 黄金胶囊改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 150-152.

(责任编辑: 骆欢欢)