

石斛合剂对 *db/db* 小鼠肝胰岛素信号通路蛋白表达的影响

张捷平 王晓宁 余文珍 郑燕芳 陈雪花 施红

(福建中医药大学中西医结合学院,福州,350122)

摘要 目的:观察石斛合剂序贯治疗对 *db/db* 小鼠肝胰岛素信号通路蛋白基因表达的影响,探讨其调节血糖的分子机制。方法:选取 12~14 周龄雄性 *db/db* 小鼠,按空腹血糖及体质量随机分成模型组、二甲双胍组、石斛合剂序贯组(以下简称序贯组);选 *db/m* 为正常对照组。连续灌胃给药共 6 个循环(54 d)。观察各组治疗后各组空腹血糖(FBG)、口服葡萄糖耐量(OGTT)、糖化血清蛋白(GSP)、血清胰岛素(Ins)、三酰甘油(TG)及胆固醇(Tch),同时提取肝组织 RNA,以逆转录 PCR 法检测胰岛素受体(InsR)、胰岛素受体底物 1/2(IRS1/2)、PI3K mRNA 表达水平变化。结果:与模型组比较,序贯组 FBG、GSP 和 Ins 显著下降($P < 0.05$),改善葡萄糖耐量($P < 0.05 \sim 0.01$);InsR、IRS1/2、PI3K 等 mRNA 表达增加($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论:复方石斛合剂序贯治疗能有效降低 *db/db* 小鼠的降低高胰岛素血症,降低空腹血糖及血脂,改善葡萄糖耐量,可能与增加 InsR、IRS1/2、PI3K 等基因表达有关。

关键词 石斛合剂;胰岛素信号;基因表达

Effect of Shihu Compound on the Expression of Proteins of Hepatic Insulin Singal Pathways in *db/db* Mice

Zhang Jieping, Wang Xiaoning, Yu Wenzhen, Zheng Yanfang, Chen Xuehua, Shi Hong

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Shihu Compound (DC) sequential therapy on gene expression of protein of hepatic insulin signal pathways in *db/db* mice and to discuss the molecular mechanism of regulating blood sugar. **Methods:** Eighteen male *db/db* mice of 12~14 weeks old were randomly divided into model group, metformin group, and DC group according to FBG and body mass. Six *db/m* mice were taken as normal control group. They were given by continuous gavage for 6 circles (54 d). OGTT were measured at the end of the experiment. The concentrations of FBG, GSP, insulin, TG and Tch in sermm were measured, and the expression of insulin receptor, insulin receptor substrate 1/2 and PI3K in liver were assayed RT-PCR. **Results:** Compared with model group, FBG, Ins and GSP in DC group and metformin group decreased significantly ($P < 0.05$), and glucose tolerance improved ($P < 0.05 \sim 0.01$). The level of mRNA expression on InsR, IRS1/2 and PI3K were increased. **Conclusion:** Dendrobium Compound sequential treatment effectively reduced glucose and lipid, and improved glucose tolerance in *db/db* mice, which could be associated with increased the expressions of components in the insulin signal pathway, such as InsR, IRS1/2 and PI3K.

Key Words Dendrobium compound; Insulin signal; Gene expression

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.043

胰岛素抵抗是指各种原因导致生理剂量的胰岛素不足以对靶细胞产生正常生物学效应,机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症,其是糖尿病发生与演变的重要病理特征。研究表明,胰岛素信号通路蛋白结构与数量的异常,是胰岛素抵抗的重要原因^[1]。前期临床与基础研究表明石斛合剂能减少 2 型糖尿病模型动物胰岛细胞凋亡、促进胰岛素分泌,降低血糖,改善血脂,减轻 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的作用^[2-6]。本研究拟从胰岛素信号角

度,观察石斛合剂对胰岛素信号蛋白基因表达的影响,从而进一步阐明其改善糖脂代谢、缓解胰岛素抵抗的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 *db/db* 小鼠 18 只,体质量为 (45.2 ± 3.2) g; *db/m* 小鼠 6 只,体质量为 (26.2 ± 2.3) g。所有小鼠均为雄性,12~14 周龄。由北京大学(医学部)实验动物科学部提供(许可证号为 SCXK(京)2011-0012),饲养于福建中医药大学实验

基金项目:福建省自然科学基金项目(编号:2013J01332);福建中医药大学重点学科专项校管课题(编号:X2014026-学科)

作者简介:张捷平(1976.12—),男,理学硕士,副教授,从事中西医结合防治糖尿病的基础与临床研究,E-mail:zhjieping@163.com

通信作者:施红(1964.04—),女,博士,博士研究生导师,教授,研究方向:主要从事中西医结合延缓衰老及中医药防治糖尿病的研究工作,E-mail:shihong3327@sina.com

动物中心 SPF 级环境,自由摄食、饮水,室温 20 ~ 23 ℃,空气流通,相对湿度 55% ~ 70%,12 h 光照昼夜循环。

1.2 药物 石斛合剂 1 方(石斛、黄芪、五味子、葛根、玄参、黄连、丹参、栀子、瓜蒌等),石斛合剂 2 方(茵陈、大黄、栀子、柴胡、车前子、瞿麦等),上述中药饮片购于福建中医药大学国医堂。以 6 倍体积水煎 2 次后过滤,滤液合并后分别浓缩至含生药量 2 g/mL、1 g/mL),二甲双胍(20 mg/mL,批号: H20023370,中美上海施贵宝制药有限公司)。

1.3 试剂及仪器 胰岛素(insulin,Ins)放免试剂盒(批号 20150320,北京市福瑞生物工程公司),三酰甘油(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,Tch)、糖化血清蛋白(glycosylated serum protein,GSP)检测试剂盒(批号 20150120,20150115,20150301,南京建成生物技术公司),Trizol(批号 15596026,美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(批号 00111863,Fermentas 公司),实时定量 PCR 试剂盒(批号 AK5501,宝生物工程(大连)有限公司),DU730 型核酸蛋白分析仪(BACKMAN 公司),拜安捷型快测血糖仪(拜尔医药保健有限公司),7500 Fast Dx 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司)。

1.4 分组及给药 db/db 小鼠适应性喂养 1 周后,选取空腹血糖(Fasting Blood Glucose,FBG)≥11.1 mmol/L 为糖尿病模型,按 FBG 及体质量分层后,随机分为模型组、西药组、石斛合剂序贯组(以下简称序贯组),每组各 6 只。另取 6 只表型正常的 db/m 小鼠为正常组。西药组给予二甲双胍 0.2 g/(kg·d);序贯组以石斛合剂(药量按小鼠与人体表比换算算法计算,相当于临床用量 12 倍)序贯治疗,1 方(24 g/kg·d)4 d,续以 2 方(12 g/kg·d)3 d 为 1 个疗程,每次换方停药 1 d,共 6 个疗程(54 d)。正常组与模型组均按体质量给予等体积生理盐水。各组均为灌胃给药,2 次/d。

1.5 指标观察

1.5.1 口服糖耐量试验(OGTT) 治疗周期结束后,禁食不禁水 10 h,测空腹血糖后,小鼠按 2 g/kg 葡萄糖灌胃,测定 0.5 h、1 h、2 h 的血糖。

1.5.2 血清学指标测定 第二天,禁食后眼眶采血,分离血清,采用放射免疫学方法检测 Ins,氧化酶法测定 TG 与 TC,果糖胺法测定 GSP。同时,取肝组织液氮保存。

1.5.3 RT-PCR 检测肝组织胰岛素信号蛋白 mRNA

表达 采用 TRIzol 法提取大鼠肝细胞总 RNA,并琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 Olig(dT)₁₈ 为引物 42 ℃ 逆转录合成 cDNA。根据 GeneBank 提供的基因序列,以 Prime 5.0 软件设计 InsR、IRS1、IRS2、PI3K、β-actin 基因引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表 1。实时荧光定量 PCR 扩增反应体系 20 μL,含 SYBR Primix Ex Taq™ II 10 μL、cDNA 2 μL、上下游引物各 0.8 μL、ROX Reference Dye II 0.4 μL、ddH₂O 6 μL。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s,循环条件为:95 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 30 s,共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 方法对相应基因 mRNA 的表达进行定量分析,即处理组基因表达相对于正常对照组的变化倍数为 2^{-ΔΔCt} 倍。

表 1 实时定量 PCR 的引物

基因	扩增产物(bp)	引物对
InsR	134	5'-TTTTTGTCCCCAGGCCATCC-3'
		5'-CCTGTGCTCCTCTGACTTG-3'
IRS1	128	5'-TTAGGCAGCAATGAGGGCAA-3'
		5'-TCTTCATCTCTGCTGTGATGTCCA-3'
IRS2	197	5'-CGCAGCCAGGAGACAAGAAC-3'
		5'-AGCGCTTCACTCTTTACGAC-3'
PI3K	180	5'-CACCATTACAAAGAAAGCCGGA-3'
		5'-GGGCAGTGTGCTGGTGGAT-3'
β-actin	96	5'-CGCAGCCACTGTGAGTC-3'
		5'-GTCATCCATGGCGAACTGGT-3'

1.6 统计学方法 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 19.0 进行统计分析,多组样本均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 或 t' 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 石斛合剂对 db/db 小鼠 OGTT 的影响 与正常组比较,模型组 db/db 小鼠 FBG 明显上升(P < 0.01),在口服葡萄糖 0.5 h 后血糖明显上升(P < 0.01),1 h、2 h 血糖下降缓慢(P < 0.01)。与模型组比较,西药组与序贯组 FBG 均明显下降(P < 0.01),在口服葡萄糖 0.5 h 后血糖低于模型组(P < 0.05),1 h、2 h 血糖持续下降(P < 0.01),西药组与序贯组无统计学意义(P > 0.05)。见表 2。

2.2 石斛合剂序贯治疗对 db/db 小鼠 GSP、Ins、Tch 和 TG 的影响 与正常组比较,模型组 db/db 小鼠的 GSP、Ins、Tch 和 TG 明显升高(P < 0.05 ~ 0.01);与模型组比较,西药组二甲双胍治疗使 GSP、Ins、Tch 和 TG 均有显著性下降(P < 0.05 ~ 0.01);序贯组 GSP、Ins 和 TC 均有显著性下降(P < 0.01),TG 有所下降,但变化无统计学意义(P > 0.05)。见表 3。

表 2 石斛合剂序贯治疗对 *db/db* 小鼠 OGTT 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	血糖 (mmol/L)			
		0 h	0.5 h	1 h	2 h
正常组	6	5.17 ± 0.67	12.45 ± 2.50 **	10.45 ± 1.69	8.82 ± 1.26
模型组	6	17.57 ± 3.78 **	34.35 ± 2.25 **	33.47 ± 2.04 **	24.98 ± 4.41 **
西药组	6	11.06 ± 2.70 **△△	25.47 ± 4.73 **△	21.63 ± 3.62 **△△	15.01 ± 3.56 **△△
序贯组	6	11.77 ± 2.77 **△△	27.38 ± 3.76 **△	18.98 ± 2.77 **△△	13.95 ± 2.21 **△△

注: * 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ** 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); △ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); △△ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 3 石斛合剂序贯治疗对 *db/db* 小鼠 GSP、Ins、TC 和 TG 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	GSP (mg/mL)	Ins (mU/L)	Tch (mmol/L)	TG (mmol/L)
正常组	6	0.39 ± 0.02	52.79 ± 16.04	2.86 ± 0.51	0.89 ± 0.21
模型组	6	0.54 ± 0.05 **	230.82 ± 18.49 **	6.21 ± 1.38 **	1.27 ± 0.08 *
西药组	6	0.41 ± 0.04 △△	135.70 ± 21.08 **△△	4.95 ± 0.92 **△	0.86 ± 0.09 △△
序贯组	6	0.41 ± 0.02 △△	86.50 ± 18.40 *△△	3.79 ± 0.84 △△	1.07 ± 0.17

注: * 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ** 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); △ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); △△ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 4 石斛合剂对 *db/db* 小鼠肝 InsR、IRS1、IRS2 和 PI3K mRNA 表达比率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	InsR	IRS1	IRS2	PI3K
正常	6	1	1	1	1
模型	6	0.43 ± 0.07 **	0.58 ± 0.08 **	0.71 ± 0.10 **	0.66 ± 0.11 **
西药组	6	0.81 ± 0.09 △△	1.27 ± 0.11 **△△	0.80 ± 0.11 △	0.94 ± 0.09 △
序贯组	6	2.25 ± 0.31 **△△	1.87 ± 0.33 **△△	1.36 ± 0.16 **△△	2.32 ± 0.35 **△△

注: * 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ** 表示与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); △ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); △△ 表示与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 石斛合剂对 *db/db* 小鼠肝 InsR、IRS1、IRS2 和 PI3K mRNA 表达比率的影响 与正常组相比较,模型组肝细胞 InsR、IRS1/2、PI3K mRNA 均呈现表达下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较,西药组与序贯组 InsR、IRS1/2、PI3K 有不同程度表达增加, ($P < 0.01$)。见表 4。

3 讨论

糖尿病属中医学的“消渴”范畴。各种因素如饮食不节、劳欲过度、禀赋不足、情志失调等,均可导致气机郁结,郁久积热,伤阴化燥,出现“消渴”;日久阴伤气耗,使气阴两伤,经脉失于濡养,阴阳气血失调,最终导致阴阳两虚。施红教授根据长期临床研究,提出“阴虚为本,燥热为标,血瘀贯穿是始终,并呈现阶段性的痰、湿、热”是糖尿病的基本病机特点;通过临床-基础-临床的反复探索,形成“滋阴益气活血泄浊”序贯的新疗法^[7]。即在西医糖尿病基础治疗,使用石斛合剂 1 号方(5 d) + 2 号方(3 d),反复循环治疗。1 号方以石斛、生地黄、知母滋阴清热,黄芪、丹参益气活血,五味子、葛根补益脾肾,诸药相须为用,上中下兼顾,甘温化气,酸甘养阴,苦寒清热润燥,三消分治;2 号方以茵陈清利湿热,栀子

通利三焦,大黄泻热逐瘀,扁蓄除湿止痒,以滑石佐清利湿热,诸药合力以清肝利湿泄浊,利于毒秽排出体外。临床资料显示该序贯疗法可明显改善阴虚热盛、气阴两虚证的 2 型糖尿病患者燥热、烦渴、盗汗等临床症状,显著降低血糖,改善血脂^[8]。

db/db 小鼠是 C57BL/6J 小鼠中瘦素受体基因缺陷的突变系,具有高胰岛素血症、高血糖、肥胖等代谢异常,是类人类 2 型糖尿病理想的动物模型之一。由于 *db/db* 小鼠瘦素受体基因缺陷,形成瘦素抵抗状态,导致胰腺 β 细胞分泌胰岛素持续增加,产生高胰岛素血症^[9]。高胰岛素血症是胰岛素抵抗的关键始动因素之一,持续高胰岛素状态可降低外周组织细胞的胰岛素受体表达,减弱胰岛素信号的转导,从而减少细胞对葡萄糖的氧化利用,反馈刺激胰岛素分泌进一步增加,造成恶性循环^[1]。故降低高胰岛素血症,提高胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗,是降低血糖及治疗糖尿病的关键环节。

本实验我们观察到 *db/db* 小鼠表现严重的高胰岛素血症,糖耐量受缺损,OGTT 试验的血糖持续维持高水平,血脂 TG 与 Tch 明显上升,反映机体处于严重胰岛素抵抗状态,糖脂代谢紊乱。经过石斛合

剂的序贯治疗, *db/db* 小鼠的葡萄糖耐量增加, 血脂 TG 与 Tch 有不同程度的降低, 血清胰岛素水平明显下降, 提示糖脂代谢显著改善, 其可能与胰岛素水平下调, 胰岛素敏感性增加有关。

在胰岛素信号转导过程中, 胰岛素与靶细胞表面的胰岛素受体 (Insulin Receptor, InsR) α 亚基结合, 诱导细胞内的 β 亚基自我磷酸化并表现出酪氨酸激酶活性。胰岛素受体底物 1/2 (Insulin Receptor Substrates1/2, IRS1/2) 通过识别并结合磷酸化的 InsR 被活化, 进一步激活其下游磷脂酰肌醇 3 激酶 (Phosphatidylinositol 3-hydroxy Kinase, PI3K), 催化生成 3,4,5-三磷酸脂酰肌醇, 通过变构调节激活磷酸肌醇依赖性激酶 (Phosphoinositide-dependent kinase, PDK), 活性化 Akt, 进而通过调节 Glut4、GSK-3、Foxo1 等蛋白参与代谢调节^[10]。因此, 胰岛素信号转导的蛋白结构异常或数量的减少, 都将导致信号转导的障碍, 影响胰岛素的生理效应减弱, 产生代谢紊乱^[11]。大量研究表明, 不同中药或复方可通过调节胰岛素信号转导, 促进糖脂代谢^[12]。如小檗碱、麦冬多糖、黄芪多糖、葛根素、牡丹皮多糖、大黄等提高 InsR、IRS1、PI3K 表达水平, 激活 PI3K/Akt 通路, 增加对胰岛素的敏感性, 调节胰岛素信号转导。

在本实验中, 我们观察到具有高胰岛素血症的 *db/db* 小鼠肝细胞 InsR 明显下降, 这与前期实验高胰岛素培养的 HepG2 细胞表现一致^[13], 同时肝细胞 IRS1、IRS2 与 PI3K 等下游信号蛋白 mRNA 表达也出现不同程度表达下调, 提示在高胰岛素状态下, InsR 表达下调导致与胰岛素结合率下降, 胰岛素信号跨膜转导障碍, IRS1/2、PI3K 基因表达减少加重胰岛素抵抗的程度。经石斛合剂序贯治疗后, InsR、IRS1/2、PI3K mRNA 表达出现明显增加。我们推测 InsR 基因表达的上调有助于提高胰岛素与受体的结合率, 增加胰岛素敏感性, 加速胰岛素信号的跨膜转导; 同时胞内胰岛素信号蛋白 IRS1/2、PI3K 的基因表达增加, 有助信号继续快速传递, 从而缓解胰岛素抵抗, 改善糖脂代谢。

综合上述结果分析, 石斛合剂序贯治疗能明显降低 *db/db* 小鼠 FBS、GSP、糖化血清蛋白、血脂与胰岛素水平, 改善糖耐量, 可能与促进胰岛素信号通路蛋白 InsR、IRS1/2、PI3K 基因表达有关。为石斛合剂临床有效防治糖尿病、改善胰岛素抵抗, 提供理论依据。真核生物的基因表达调控主要受顺式作用元件 (如启动子) 与反式作用因子 (如转录因子) 相互

作用的调节, 这将是今后探索调节基因表达分子机制的重要切入点。此外, 血液循环中胰岛素水平受胰岛 β 细胞的胰岛素分泌率与胰岛素清除率的共同调节。目前认为受体介导的内吞作用是胰岛素清除的主要机制, 胰岛素降解酶是其关键酶^[14-15]。因此, 石斛合剂对高胰岛素血症的下调作用, 是否通过抑制胰岛素分泌或 (和) 促进胰岛素内吞降解有关, 也值得进一步研究。

参考文献

- [1] Nolan CJ, Ruderman NB, Kahn SE, et al. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2015, 64 (3): 673-686.
- [2] 王晓宁, 郑燕芳, 余文珍, 等. 石斛合剂等降糖中药方对衰老糖尿病大鼠胰腺 PCNA、NF- κ Bp65 的影响. [J]. 世界中医药, 2016, 11 (2): 296-300.
- [3] 郑燕芳, 施红, 杨秀珍. 石斛合剂对胰岛细胞分泌功能的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30 (7): 551-553.
- [4] 林雅, 余文珍, 郑燕芳, 等. 石斛合剂对糖尿病大鼠模型血糖血脂代谢的影响 [J]. 福建中医药大学学报, 2012, 22 (3): 22-23.
- [5] 施红, 高长花, 刘宏波, 等. 石斛合剂序贯疗法对糖尿病模型大鼠糖脂代谢的影响 [J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23 (6): 17-19.
- [6] 张捷平, 郑晓玲, 洪佳祝, 等. 复方石斛合剂治疗 2 型糖尿病 90 例 [J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21 (5): 6-8.
- [7] 林心君, 施红. 施红教授石斛合剂序贯疗法治疗糖尿病之思路中医临床研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6 (1): 18-19.
- [8] 施红, 张学敏, 崔乙, 等. 糖尿病石斛合剂序贯法的初步临床观察 [J]. 中医临床研究, 2013, 5 (18): 1-3.
- [9] Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes [J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10 (2): 131-145.
- [10] Longnus SL, Ségalen C, Giudicelli J, et al. Insulin signalling downstream of protein kinase B is potentiated by 5'AMP-activated protein kinase in rat hearts in vivo [J]. Diabetologia, 2005, 48 (12): 2591-2601.
- [11] Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance [J]. Dan Med J, 2014, 61 (7): B4890.
- [12] 柯仲成, 侯雪峰, 贾晓斌. 基于活性成分的降血糖中药应用思路及方法探讨 [J]. 中草药, 2016, 47 (10): 1797-1805.
- [13] 张捷平, 秦崇涛, 林凡, 等. 复方石斛合剂调节胰岛素受体表达促进 HepG2 细胞糖代谢 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32 (22): 4930-4932.
- [14] Kotronen A, Vehkavaara S, Seppala-Lindroos A, et al. Effect of liver fat on insulin clearance [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 293 (6): E1709-E1715.
- [15] Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Protzek AO, et al. Endurance training inhibits insulin clearance and IDE expression in Swiss mice [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): e0118809.