

糖脂平对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS-1 磷酸化及 GLUT4 分布的影响

周 晖¹ 高彦彬² 李 丽³ 夏 晶¹ 周焰实¹ 张涛静¹

(1 北京中医药大学东方医院,北京,100078; 2 首都医科大学中医药学院,北京,100069; 3 北京大学医学部生理学与病理生理学系,北京,100191)

摘要 目的:观察糖脂平对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS-1 磷酸化及 GLUT4 分布的影响。方法:将 24 只清洁级 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、中药组和西药组,采用高糖高脂饲料喂养方法造模成功后,分别给予生理盐水、糖脂平和二甲双胍灌胃,给药 8 周后,用 Western Blot 方法检测大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 和磷酸化 Akt 的含量,用免疫荧光法观察大鼠骨骼肌 GLUT4 的分布情况。结果:实验末,与对照组比较,模型组大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 和磷酸化 Akt 含量明显降低,中药组和西药组大鼠的骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 和磷酸化 Akt 含量与模型组比较均明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),中药组和西药组的组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组 GLUT4 分布于骨骼肌肌膜表面,模型组 GLUT4 膜分布明显减少,出现胞质分布,中药组和西药组 GLUT4 的膜分布较模型组明显改善。结论:糖脂平通过促进 IRS-1 的酪氨酸磷酸化,激活其下游 PI3K,增加磷酸化 Akt 含量,进而使胞质内 GLUT4 膜转位增加,从而改善胰岛素抵抗。
关键词 胰岛素抵抗;糖脂平;骨骼肌;胰岛素受体底物 1;葡萄糖转运体 4

The Effect of Tangzhiping on Phosphorylation of IRS-1 and Distribution of GLUT4 in Skeletal Muscle in Rats with Insulin Resistance

Zhou Hui¹, Gao Yanbin², Li Li³, Xia Jing¹, Zhou Yanshi¹, Zhang Taojing¹

(1 Oriental Hospital affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2 Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China; 3 Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Tangzhiping on phosphorylation of IRS-1 and distribution of GLUT4 in skeletal muscle in rats with insulin resistance. **Methods:** SD rats of total 24 were randomly divided into four groups: Chinese medicine group, western medicine group, control group and model group. The rat model of insulin resistance (IR) was established by feeding with high-fat and high-salt diet. Rats in Chinese medicine and western medicine group were treated with Tangzhiping and metformin respectively for eight weeks. Eight weeks later, western blot test was used to detect tyrosine phosphorylation of IRS-1 and phosphorylation of Akt. Immunofluorescence assay was used to observe distribution of GLUT4 in skeletal muscle. **Results:** The level of tyrosine-phosphorylated IRS-1 and phosphorylated Akt in rats of the model group was significantly lower than that in rats of control group. Treatment of IR rats with Tangzhiping or metformin elevated the level of tyrosine-phosphorylated IRS-1 and phosphorylated Akt ($P < 0.01$), when compared with the model group. There was no statistical differences between Chinese medicine group and western medicine group ($P > 0.05$). GLUT4 was distributed predominantly on the membrane of skeletal muscle in rats of control group. GLUT4 distribution on membrane was significantly attenuated and GLUT4 distribution in plasma appeared in skeletal muscle of rats in the model group, which was improved by Chinese medicine and western medicine treatment. **Conclusion:** Tangzhiping can elevate insulin resistance by promoting the phosphorylation of IRS-1 and its downstream signal Akt and increasing the translocation of GLUT4 from cytoplasm to membrane.

Key Words Insulin resistance; Tangzhiping; Skeletal muscle; Insulin receptor substrate 1; Glucose transporter 4

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.032

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 是多种代谢疾病发生发展的共同的病理生理学基础。IR 的发生主要涉及肝脏、骨骼肌和脂肪组织,其中骨骼肌是葡萄糖代谢过程中最为重要的组织,所以有关骨骼

肌 IR 的研究抗越来越受到重视,甚至有人认为骨骼肌胰岛素抵抗的发生早于其他组织,是外周胰岛素抵抗的主要靶位^[1]。糖脂平是我们在临床上干预糖调节受损和早期糖尿病的经验方药,具有确切的临

床疗效^[2-3]。本研究通过观察糖脂平对 IR 大鼠骨骼肌细胞受体后信号转导通路中胰岛素受体底物 1 (Insulin Receptor Substrate 1, IRS-1) 的酪氨酸磷酸化及葡萄糖转运体 4 (Glucose Transporter Type 4, GLUT4) 在骨骼肌细胞膜分布的影响, 从而探究糖脂平改善 IR 的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 180 ~ 200 g, 采购自北京大学医学部实验动物中心。

1.2 动物饲料 基础饲料购自北京科澳协力饲料有限公司; 高脂高盐饲料是在基础饲料的基础上加猪油 21%、胆固醇 1.5%、食盐 2% 制成, 热量比为碳水化合物占 20%, 脂肪占 59%, 蛋白质占 21%, 购自北京科澳协力饲料有限公司。

1.3 实验药品与试剂 糖脂平由丹参、泽泻、鬼箭羽、黄连等组成, 由北京中医药大学东方医院制剂中心加工, 制成 2 g 生药/ML 的药液; 盐酸二甲双胍片购自北京中医药大学东方医院药房, 中美上海施贵宝制药有限公司生产; 裂解缓冲液; 蛋白标准品; 1:200 p-IRS-1 抗体(兔来源); 1:200 IRS-1 抗体(兔来源); 1:200 p-Akt 抗体(兔来源); 1:200 Akt 抗体(兔来源); 1:200 羊抗兔二抗; 20% 马血清封闭液; GLUT4 抗体(羊来源 1:100); 兔抗羊 FITC 标记的荧光二抗(1:400); ECL 发光液。

1.4 实验仪器 稳压稳流电泳仪: DYY-6B 型, 中国北京六一仪器厂生产; 图像分析系统: 550IW 型, 德国 LEICA 公司生产; 紫外/可见分光光度计: Biophotometer 型, 德国 EPPENDORF 公司生产; 激光共聚焦扫描显微镜: TCSSP2 型, Leica 公司生产; 低温台式离心机: 5417R 型, 德国 EPPENDORF 公司生产。

2 方法

2.1 建立模型 采用高脂高盐饲料喂养方法造模^[4]。用基础饲料适应性饲养 1 周后的 SD 大鼠被随机分为 4 组: 对照组、模型组、中药组、西药组, 对照组继续用基础饲料喂养, 另 3 组改用高脂高盐饲料喂养, 自由摄食、饮水, 明暗周期 12/12 h。第九周末空腹断尾采血测血糖 (FPG) 和胰岛素 (FINS), 计算胰岛素作用指数 [IAI = $-\ln(\text{FPG} \times \text{FINS})$], 以对照组 IAI 的均数减 2 个标准差为标准, 低于该值的大鼠为造模成功。

2.2 分组处理 造模成功的大鼠从第 10 周开始按不同组别给药, 西药组给予盐酸二甲双胍 200 mg/(kg·d) 灌胃; 中药组给予糖脂平 10 mL/(kg·d) [生药 20 g/(kg·d)] 灌胃; 模型组和对照组灌服等

量的蒸馏水。各组大鼠喂养饲料和条件不变, 连续给药观察 8 周。

2.3 取材与组织准备 禁食 12 h 后处死, 迅速取腓肠肌于 -70 °C 冻存备用。

2.4 Western blot 检测酪氨酸磷酸化 IRS-1 的含量 提取骨骼肌总蛋白, 并用 Bradford's 法测定所提蛋白质浓度。使用 Tris-HCl/SDS 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后采用湿法电转印将蛋白转到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜在 5% 脱脂奶粉中室温温育 2 h 后, 加入封闭液和 1:200 p-IRS-1 抗体(一抗), 4 °C 孵育过夜。用 1 × PBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 然后加入 1:200 二抗, 37 °C 孵育 2 h 后用 1 × PBST 洗膜 3 次, 10 min/次。用化学发光法检测条带 (p-IRS-1)。洗膜后重复上述操作, 一抗改为非磷酸化 IRS-1 抗体, 用化学发光法检测条带 (总 IRS-1)。各样本光密度值经非磷酸化 IRS-1 的光密度值校正后, 以对照组为 100%, 计算其余各组的相对值。

2.5 Western blot 检测磷酸化 Akt 的含量 实验方法同 2.4, 一抗分别改为 1:200 p-Akt 抗体和 1:200 非磷酸化 Akt 抗体。各样本光密度值经非磷酸化 Akt 的光密度值校正后, 以对照组为 100%, 计算其余各组的相对值。

2.6 观察大鼠骨骼肌 GLUT4 膜转位情况 制作 7 μm 骨骼肌组织冰冻切片后用冷丙酮固定, PBS 洗涤后马血清室温封闭 10 min, 滴加抗 GLUT4 的抗体, 4 °C 湿盒内孵育过夜。PBS 冲洗后滴加 FITC 标记的二抗, 室温孵育 1 h。PBS 洗涤, 甘油封片, 立即在激光共聚焦扫描显微镜下观察。

2.7 数据处理 所有数据录入 SPSS 18.0 统计分析软件包并进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量的变化情况 实验末, 与对照组比较, 模型组大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量明显降低, 中药组和西药组大鼠的骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量与模型组比较均明显升高, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 中西药组的组间比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

3.2 各组大鼠骨骼肌磷酸化 Akt 含量的变化情况 实验末, 与对照组比较, 模型组大鼠骨骼肌磷酸化 Akt 含量显著降低, 中药组和西药组大鼠的骨骼肌磷酸化 Akt 含量与模型组比较均升高, 升高幅度差

异有统计学意义($P < 0.01$),中西药组的组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 各组大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	灰度值(%)
对照组	6	100
模型组	6	43.44 ± 3.30
中药组	6	77.28 ± 6.10 [▲]
西药组	6	78.38 ± 9.28 [▲]

注:▲与模型组比较, $P < 0.01$ 。

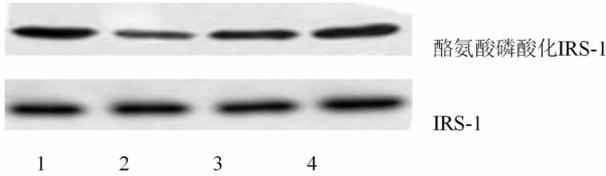


图1

注:1. 对照组,2. 模型组,3. 中药组,4. 西药组。

表2 各组大鼠骨骼肌磷酸化 Akt 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	灰度值(%)
对照组	6	100
模型组	6	61.01 ± 10.12
中药组	6	84.74 ± 12.36 [▲]
西药组	6	82.25 ± 8.78 [▲]

注:▲与模型组比较, $P < 0.01$ 。

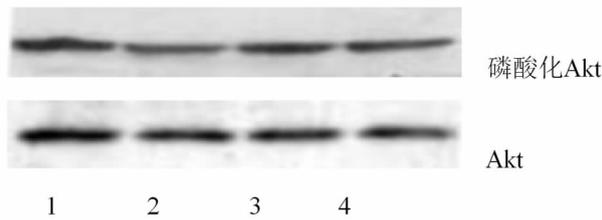


图2

注:1. 对照组,2. 模型组,3. 中药组,4. 西药组。

3.3 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 膜转位的情况 结果见图3,从图中可以看出,对照组 GLUT4 分布于骨骼肌肌膜表面,模型组 GLUT4 膜分布明显减少,且荧光强度减弱,出现胞质分布,中药组和西药组 GLUT4 表现为膜分布增多,较模型组明显改善。

4 讨论

IR 是指骨骼肌、肝脏和脂肪等外周组织对胰岛素作用的敏感性和反应性下降,进而出现正常胰岛素水平产生低于正常生物学效应的一种病理状态。临床研究证实,肥胖和 2 型糖尿病人群普遍存在胰岛素抵抗,且贯穿于 2 型糖尿病的整个发生发展过程中;胰岛素抵抗与脂代谢紊乱、高血压病、冠心病、脑卒中以及微量白蛋白尿有关,是导致这些疾病共同的病理生理学基础^[5]。胰岛素抵抗的发生机制极

为复杂,涉及骨骼肌、肝脏和脂肪等多个组织和器官,至今仍不能完全明了。由于骨骼肌是人体内葡萄糖代谢最重要的组织,所以骨骼肌 IR 越来越引起专家学者的重视,甚至有人认为骨骼肌胰岛素抵抗的发生早于其他组织,是外周胰岛素抵抗的主要靶位^[1]。

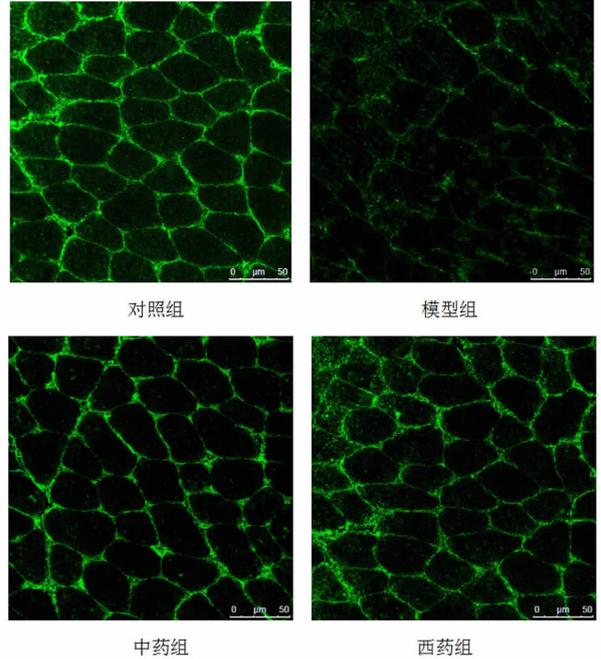


图3 各组大鼠骨骼肌 GLUT4 的膜分布情况

骨骼肌细胞线粒体功能障碍导致的肌细胞内脂质蓄积是引发胰岛素受体后信号转导通路缺陷的重要因素^[6]。线粒体是脂肪酸 β-氧化的重要场所,当骨骼肌线粒体生物合成减少或氧化磷酸化能力下降时,线粒体内脂肪酸的氧化利用减少,导致胞质内长链脂酰辅酶 A 及二酰基甘油(DG)堆积,后者可激活新型 PKC(nPKC),nPKC 能促进 IRS-1 的丝氨酸位点发生磷酸化,继而干扰胰岛素刺激下 IRS-1 的酪氨酸位点磷酸化,使其对下游磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)的激活能力下降,胞质内 GLUT4 膜转位减少,阻碍胰岛素信号通路的正常转导,进而导致胰岛素抵抗的发生^[7]。

通过参阅大量古今文献,结合证候学研究结果,我们认为,IR 的发生是在先天禀赋异常的基础上,加之后天饮食不节,嗜卧少动,精神紧张,忧思过度等多种因素共同作用的结果。饮食不节,过食肥甘,五谷精微停聚内蕴,化生湿浊,凝结为痰,阻遏气机,气机不畅,血运随之,而致气血壅滞,终致血瘀痰阻。嗜卧少动,“形不动则精不流,精不流则气郁”,气郁血停,津液不化,凝聚为痰,痰浊血瘀互结为患。精神紧张,忧思过度,气机郁结不行,导致痰浊血瘀停

滞互结。痰浊与血瘀,互为因果,相互影响,互为促进,随着疾病的发展,痰瘀互结壅遏气机,影响到脏腑功能,使五脏六腑功能失常,气血津液代谢失衡,从而变证百出^[8]。基于这一认识并结合大量临床资料,我们提出 IR 发生的核心病机是痰瘀互阻,中医药干预 IR 的基本治法应该是化痰活血,临床上我们将糖脂平用于治疗痰瘀互阻型的早期糖尿病或糖尿病前期,疗效显著^[9]。我们前期完成的国家“十一五”科技支撑计划课题和国家中医药管理局课题证实,糖脂平可降低糖耐量低减患者发生糖尿病的危险度,明显增加代谢综合征患者的胰岛素敏感性,纠正糖脂代谢紊乱^[2-3],并且可以抑制炎症反应因子的分泌,改善血管内皮功能^[10-11]。我们在高脂喂养的胰岛素抵抗大鼠模型上发现:糖脂平通过增加脂肪组织 PPAR- γ 和脂联素的基因表达,抑制炎症反应因子的分泌来改善胰岛素敏感性、纠正糖脂代谢紊乱。

有氧运动能够使骨骼肌有氧代谢酶类浓度增加,提高糖脂代谢能力,增加脂肪供能的比例和肌细胞内线粒体的体积与数量,改善胰岛素抵抗。其作用机制包括增加骨骼肌 IRS-1 (Tyr612) 磷酸化和 GLUT4 mRNA 表达^[12],增加骨骼肌中 AMPK 蛋白表达^[13],激活骨骼肌 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号传导通路,使线粒体生物合成和氧化能力提高^[14]。从以往中医药干预胰岛素抵抗的实验研究来看,多种中药成分及复方可以通过调节肝脏胰岛素信号转导通路,从而改善实验性动物模型肝脏的胰岛素抵抗^[15-17],而关于骨骼肌胰岛素抵抗及其信号转导通路的干预研究比较少。通过本研究的结果,我们发现,采用高盐高脂饲料喂养的 IR 模型大鼠骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量明显降低,中药干预后的酪氨酸磷酸化 IRS-1 含量较模型大鼠明显升高,进而使磷酸化 Akt 水平升高,从而使 GLUT4 在肌细胞膜表面分布增加,增加骨骼肌细胞对葡萄糖的转运利用,改善骨骼肌细胞的胰岛素抵抗。

综上所述,中药糖脂平通过改善降低的骨骼肌酪氨酸磷酸化 IRS-1 水平,从而改善 GLUT4 肌细胞膜表面分布状况,达到增加骨骼肌对葡萄糖的转运和利用,改善胰岛素抵抗。

参考文献

- [1] Petersen KF, Dufour S, Savage DB, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(31): 12587-12594.
- [2] 高彦彬, 周晖, 关崧, 等. 中药糖脂平胶囊干预糖耐量低减的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(12): 846-849.
- [3] 周晖, 高彦彬. 化痰降浊合剂对代谢综合征患者糖脂代谢的影响 [J]. 天津中医药, 2008, 25(5): 364-366.
- [4] 曹廷兵, 闫振成, 沈成义, 等. 代谢综合征大鼠模型的建立及其相关基因表达变化的研究 [J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(8): 702-705.
- [5] 刘超, 祝群. 代谢综合征的争议与共识 [J]. 医学与哲学: 临床决策论坛版, 2009, 30(6): 58-59.
- [6] Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha [J]. Diabetes, 2002, 51(7): 2005-2011.
- [7] Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance [J]. Circ Res, 2008, 102(4): 401-414.
- [8] 周晖, 罗文益, 陈莹, 等. 2 型糖尿病合并代谢综合征中医证候演变规律研究 [J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2009, 16(6): 1-3.
- [9] 周晖, 高彦彬, 罗文益, 等. 中西医结合治疗 II 型糖尿病合并代谢综合征病例回顾研究 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(1): 73-75.
- [10] 周晖, 高彦彬. 糖脂平合剂对代谢综合征患者血管内皮功能的影响 [J]. 北京中医药, 2011, 30(12): 918-920.
- [11] 周晖, 高彦彬. 糖脂平对代谢综合征患者胰岛素敏感性及炎症因子的影响 [J]. 现代中医杂志, 2015, 22(3): 11-14.
- [12] 张明军. 运动对 Fetuin-A 诱导的胰岛素抵抗鼠骨骼肌 IR 和 IRS1 磷酸化的影响 [J]. 体育学刊, 2014, 21(2): 141-144.
- [13] 牛燕媚, 苑红, 刘彦辉, 等. 有氧运动对胰岛素抵抗小鼠骨骼肌球形脂联素及腺苷酸活化蛋白激酶的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(1): 36-40.
- [14] Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1 [J]. Nature, 2010, 464(7293): 1313-1319.
- [15] 梁湘樱, 张红杰, 朱凌云, 等. 金银花提取物对小鼠肝脏和人肝细胞 PGC-1 α 表达及胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国糖尿病杂志, 2011, 19(3): 197-200.
- [16] 王琪, 柴单单, 吴晓华, 等. 太子参多糖减轻高脂诱导的小鼠肝脏胰岛素抵抗 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(4): 685-689.
- [17] 张先慧, 胡照娟, 张艳红, 等. 辛开苦降方对初发 2 型糖尿病 KKay 小鼠肝脏胰岛素抵抗及 IRS-2/PI3K 通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1774-1779.

(2015-07-30 收稿 责任编辑: 张文婷)