

糖耐康对自发性 2 型糖尿病 KKAy 小鼠胰岛素信号转导的影响

王 芬¹, 何华亮², 江 南², 贾淑明², 刘铜华^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 武警北京总队第二医院, 北京 100037)

[摘要] 目的: 观察糖耐康对自发性 2 型糖尿病 KKAy 小鼠胰岛素抵抗及胰岛素信号转导途径中磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3-K)、葡萄糖转运子 4(GluT4) mRNA 表达的影响。方法: 将 SPF 级 KKAy 小鼠 40 只按血糖值随机分为模型组、糖耐康高剂量组、糖耐康低剂量组、吡咯列酮组, 并选 C57bl/6J 小鼠为正常对照组, 连续灌喂给药 60 d。60 d 后测定空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(Fins)并计算胰岛素敏感指数(ISI)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、游离脂肪酸(FFA)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 并对胰岛进行病理学检查。用实时定量 RT-PCR 法测定小鼠骨骼肌和脂肪组织中 PI3-K 及 GluT4 的 mRNA 的表达。结果: 糖耐康高剂量组的 FPG、TNF- α 水平较模型组显著降低($P < 0.05$), 高、低剂量组 PI3-K 及 GluT4 mRNA 表达较模型组明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且糖耐康在一定程度上能够保护胰岛 β 细胞, 延缓 β 细胞衰竭, 对血脂及 FFA 有降低趋势。结论: 通过提高胰岛素信号转导受体后途径中 PI3-K 的表达, 从而改善 GluT4 的转位是糖耐康改善胰岛素抵抗状态的可能作用机制之一。

[关键词] 糖耐康; 胰岛素信号转导; KKAy 小鼠; 2 型糖尿病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)01-0046-04

The effect of Tangnai-Kang for Insulin signal-transduction in Spontaneous Type 2 Diabetic animal KKAy mouse

WANG Fen¹, HE Hua-liang², JIANG Nan², JIA Shu-ming², LIU Tong-hua^{1*}

(1. Traditional Chinese Medicine University of Beijing, Beijing 100029, China;

2. The Second Hospital of Peking Arme Police, Beijing 100037, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Tangnai-Kang conction for insulin resistance and expression of Phosphatidylinositol 3 Kinase Glucose Transport 4 messenger ribonucleic acid(mRNA). **Methods:** Specific pathogen free (SPF) KKAy mice 40 were divided randomly according to plasma glucose level into Models, TNK-low dosage, TNK-high dosage, Pioglitazone and normal C57BL/6J mice (normal control group). 60 days later, all animals were tested Fasting plasma glucose (PFG), Fasting insulin level for caculating Insulin Sensitivity Index(ISI), Total Cholesterol(TC), Total triacylglycerol (TG), High-density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C), Low-density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C), Floating fatty acid (FFA), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and pathological examination for the islet. The muscle and adipose expressio of PI3K and GluT4 mRNA by reverse transcriptase PCR(RT-PCR) were determined. **Results:** Compared with Model groups, FPG TNF- α levels were decreased significantly for TNK-high dosage($P < 0.05$), the expression of PI3K and GluT4 mRNA were all up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the recipe could protect β -cells in some degree and postponing β -cells failure in islet, displayed decreasing tendency to plasma lipocy and FFA levels. **Conclusions:** One of

[收稿日期] 2007-07-24

[基金项目] 北京市科技计划研发攻关课题(No: Z0005190043531)

[通讯作者] * 刘铜华, Tel: (010) 64286642; E-mail: thliu@tom.com

the mechanism of Tangnai-Kang improving insulin resistance might be up-regulated the expression of PI-3K mRNA in post-receptor of insulin signal-transduction roads, thereby increased GluT4 translocation.

[Key words] Tangnai-Kang; insulin signal-transduction; KKAY mice; Type 2 Diabetes Mellitus

2 型糖尿病(T2DM)的主要发病机理是胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)及/或胰岛素分泌不足。目前大量研究已证实,IR 不仅与 T2DM 密切相关,而且还是糖耐量减低(IGT)、肥胖症、高血压病、动脉粥样硬化、冠心病和脑血管病等多种疾病的共同危险因素。近年来应用胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物治疗胰岛素抵抗取得了一定的疗效,但由于其价格昂贵,增加体重、增加水液潴留等副作用^[1],远期疗效尚待进一步深入研究。中医药对糖尿病的防治有着悠久的历史 and 确切的疗效,但缺乏对胰岛素抵抗作用机理方面的深入研究。我们的前期研究证明,糖耐康(TNK)对延缓和改善糖耐量异常及 2 型糖尿病的发生发展有确切的临床疗效,为进一步揭示其对 T2DM 胰岛素抵抗的作用机理,本实验从分子水平观察糖耐康对自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠胰岛素信号转导途径的影响,为寻找和开发有效的中药复方奠定实验基础,为以改善 IR 为靶点防治糖尿病及血管并发症开辟新径。

1 材料

1.1 实验动物 自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠 SPF (specific pathogen free) 级 40 只(周龄 8 周~12 周)和同周龄的 C57bl/6J 小鼠 10 只(中国医学科学院协和动物研究所),均为 ♂,单笼饲养于中国医学科学院协和药物研究所屏障级动物实验中心。质量合格证号:SCXK(京)-2005-0013。

1.2 药物与试剂 糖耐康干粉浸膏(1 g 干浸膏相当于原生药 4.5 g,由人参、夏枯草、女贞子、番石榴叶、三白草组成,四川美大康佳乐药业有限公司生产制备),各药间比例为 1:4:2:4:2,以上 5 药,用 75% 乙醇 8 倍量提取 2 次,滤过,合并 2 次滤液,回收乙醇至相对密度 1.10~1.15(60~70℃)的浸膏,备用;药渣加水煎煮 1 h,滤过,浓缩至相对密度 1.10~1.15(60~70℃)的浸膏,与乙醇提取浸膏及人参细粉混合,成细粉,加辅料混匀,制成颗粒干燥即得。研究所药材人参、女贞子、夏枯草和三白草均购于沈阳医药集团公司大东公司。其中人参药材中人参皂苷 Re Rg1 的混合含量为 0.346%;女贞子药材中齐墩果酸含量为 0.78%;番石榴叶购自广西壮族自

治区。盐酸吡咯列酮片 Pioglitazone,江苏恒瑞医药股份有限公司生产, H20040631。肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(批号:25050702)由 Rapidbio 提供, RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、dNTPs、Taq 酶、 β -Actin 均购自北京舟鼎国生物技术有限公司。

1.3 仪器 石蜡切片机 2508 型(浙江金华科迪仪器设备有限公司);显微镜 Nikon502(日本 Nikon 公司);低温高速离心机 Sigma3K30(美国 Sigma 公司);全自动生化分析仪 SYNCHRON CX4PRO(美国 BECKMAN COULTER);酶标仪 Multiskan MK3 型(Thermo);德国罗康全血糖仪及配套试纸;Gene Amp PCR System 9600(美国 Perkin Elmer), ABIPRISM 7700 Sequence Detector(美国 ABI);水浴恒温振荡器 SHA-C 型(莱华设备有限公司);Lambdal P40 紫外分光光度计(美国 PE 公司)。

1.4 饲料 基础饲料:中国医学科学院协和动物研究所小鼠全价营养颗粒饲料;高能量饲料:含 10% 蔗糖、10% 脂肪的 KKAY 小鼠专用高能量饲料。

2 方法

2.1 动物分组及给药 小鼠喂养 1 周后,断尾取血,测随机血糖值 $\geq 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者入选。查随机数字表将其分为模型组、糖耐康高剂量组($6.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、糖耐康低剂量组($1.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、西药吡咯列酮组($1.95 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中药组剂量以干粉浸膏计。均灌喂给药,给药周期为 60 d。正常 C57bl/6J 组及模型组按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 体重灌服无菌水。

2.2 取材 末次给药后禁食不禁水 12 h,断尾取血测其空腹血糖(FPG),后腹腔注射氯胺酮($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及乙酰普吗啉($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)麻醉,给与胰岛素($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)于 10 min 后,眶静脉取血,常温静置 3 h, $2500 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ 4°C 离心,分离血清, -20°C 保存。快速解剖,分别取骨骼肌和周围脂肪组织,冰上去除周围组织,编号冻存管立即放入液氮中备检。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 生化指标 血糖用德国罗康全血糖仪及配套试纸测定,血清胰岛素用放免法测定,血脂四项

(TC、TG、LDL-C、HDL-C) 用全自动生化仪测定, FFIA 和 TNF- α 均用双抗夹心酶免法(ELISA) 严格按照试剂盒说明书步骤测定。

2.3.2 胰岛素敏感指数(ISI) 采用李光伟法^[2], $ISI = 1 / \text{空腹血糖(FPG)} \times \text{空腹血清胰岛素(FINS)}$, 取自然对数。

2.3.3 胰岛组织形态 石蜡切片, HE 染色。

2.3.4 肌肉及脂肪 PI3-K 及 GluT4 采用实时定量 RT-PCR 法。按 Trizol 试剂的使用操作步骤提取总 RNA, 取 25 μg 总 RNA 于 0.5 mL 离心管中, (65~70) $^{\circ}\text{C}$ 保温 5~10 min, 离心数秒, 放置冰浴中。在此离心管中配制 20 μL 反应体系: oligo(dt) 1 μL , dNTPs 1 μL , 5 $\times$ RT buffer 4 μL , 酶混合液 1 μL , RNA 样品 3 μL , DEPC-ddH₂O 10 μL , 室温放置 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min, 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 1~5 min。定量 PCR 实验: 配置 25 μL 的反应体系, cDNA 2 μL , 10X Buffer 2.5 μL , dNTPs(10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 引物(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , Sybr green(10X) 1 μL , Taq 酶(2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , DDH₂O 17.5 μL , 每个样品做两个平行, 并设有两个空白对照。各基因引物序列为: β -actin, 正义: 5'-ATCATGTTTGAGACCTCAACA-3', 反义: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 产物长度 308 bp; PI-3K, 正义: 5'-GTTGCTCTACCCAGTGTCCAAATACCAG-3, 反义: 5'-TTTCTGCTCCCTATCCGTTCTT-3', 产物长度 200 bp; Glu T4, 正义: 5'-ACTGGCACTTCCACTGAACTCTTG-3, 反义: 5'-TTTCTGCTCCCTATCCGTTCTT-3', 产物长度 388 bp。实时定量 PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后, 进行 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 共 35 个循环。

2.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数的两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。两变量的关联性采用线性相关分析。

3 结果

3.1 各组小鼠一般状况 实验过程中正常对照组表现活跃, 反应灵敏, 皮毛光泽, 体重稳定上升。模型组及各给药组随周龄增长逐渐出现不同程度的精神萎靡、反应迟钝, 倦怠, 行动呆滞, 皮毛失润不整等。以模型组最为明显, 糖耐康低剂量组较次之, 高剂量组和西药组相对较轻。整个实验中, 共死亡 6 只, 剔出 2 只。

3.2 对小鼠 FPG、Fins、ISI 及 FFA 的影响 表 1 说

明, 模型组的 FPG、Fins、ISI 及 FFA 均高于正常组($P < 0.05$)。与模型组相比, 糖耐康低剂量组的 FPG 和 FFA 有降低趋势, Fins 及 ISI 降低显著($P < 0.01$); 高剂量组的 FPG、Fins 及 ISI 均显著降低($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), FFA 有降低趋势。糖耐康高剂量组的 Fins 和 ISI 及糖耐康低剂量组的 ISI 作用不如吡咯列酮组($P < 0.05$)。

表 1 糖耐康对小鼠 FPG、Fins、ISI 及 FFA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	FPG ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fins ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ISI	FFA ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
C57bl/6J	—	5.76 $\pm$ 0.14 ¹⁾	17.93 $\pm$ 0.05 ²⁾	-4.62 $\pm$ 0.21 ²⁾	156.45 $\pm$ 32.38 ¹⁾
模型	—	7.69 $\pm$ 0.74	50.49 $\pm$ 8.01	-5.91 $\pm$ 0.27	418.25 $\pm$ 58.36
吡咯列酮	0.001 95	5.12 $\pm$ 0.15 ¹⁾	20.89 $\pm$ 3.84 ²⁾	-4.67 $\pm$ 0.17 ²⁾	177.87 $\pm$ 38.64 ¹⁾
糖耐康	1.67	6.50 $\pm$ 0.40	22.00 $\pm$ 4.33 ²⁾	-4.93 $\pm$ 0.27 ^{2, 3)}	290.67 $\pm$ 39.04
	6.56	5.64 $\pm$ 0.41 ¹⁾	29.09 $\pm$ 6.57 ^{2, 3)}	-5.06 $\pm$ 0.19 ^{2, 3)}	246.18 $\pm$ 61.18

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与吡咯列酮比较³⁾ $P < 0.05$ (下同)

3.3 对小鼠血脂(TC、TG、HDL-C 及 LDL-C) 的影响

表 2 说明, 与正常组比较, 模型组血脂四项均明显升高, 有显著性差异($P < 0.05$); 与模型组相比, 各给药组血脂有降低趋势, 仅低剂量组 HDL-C 有差异($P < 0.05$)。

表 2 糖耐康对小鼠 TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TC	TG	HDL-C	LDL-C
C57bl/6J	—	4.06 $\pm$ 0.74 ¹⁾	1.39 $\pm$ 0.60 ¹⁾	3.96 $\pm$ 1.44 ²⁾	2.11 $\pm$ 0.61 ¹⁾
模型	—	5.42 $\pm$ 1.05	2.30 $\pm$ 0.83	1.93 $\pm$ 0.17	2.94 $\pm$ 0.69
吡咯列酮	0.001 95	4.74 $\pm$ 0.46	1.79 $\pm$ 0.86	3.72 $\pm$ 1.40	2.44 $\pm$ 0.66
糖耐康	1.67	5.36 $\pm$ 0.80	2.33 $\pm$ 0.39	2.49 $\pm$ 0.56 ¹⁾	2.65 $\pm$ 1.22
	6.56	4.93 $\pm$ 0.60	1.87 $\pm$ 0.81	3.17 $\pm$ 1.52	2.52 $\pm$ 0.64

3.4 对小鼠 TNF- α 、PI3-K 及 GluT4 mRNA 表达的影响 从表 3 可以看出, 与正常组比较, 模型组 TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$), PI3-K 及 GluT4 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 除糖耐康低剂量组的 TNF- α 水平及无显著差别, 低剂量组、高剂量组和西药组的 TNF- α 、PI3-K 及 GluT4 的 mRNA 水平改善有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 糖耐康低剂量组的 PI3-K 的 mRNA 水平改善不如吡格列酮组($P < 0.05$)。

3.5 病理改变 光镜下正常组可见胰岛和周围腺泡结构正常, 胰岛数目较多, 轮廓规则, 胰岛内细胞排列整齐, 胞浆饱满, 未见空泡变性和玻璃样变; 模型组见胰岛变小, 数目减少, 胰岛内细胞颗粒脱失, 空泡变性, 形态不规则, 细胞排列紊乱, 细胞界限不清, 核大小不等, 部分核固缩; 各用药组均有不同程

度改善。

表 3 糖耐康对小鼠 TNF-α 及 PI3-K、GluT-4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	TNF-α (pg·mL ⁻¹)	n	Ct 值之比 PI3-K/β-actin	Ct 值之比 GluT4/β-actin
C57bl/6J	—	70.93±19.67 ¹⁾	7	5.81±2.14 ²⁾	0.64±0.13 ²⁾
模型	—	192.43±66.89	6	1.04±0.26	0.19±0.06
吡咯列酮	0.00195	93.97±18.82 ¹⁾	6	5.45±1.63 ²⁾	0.54±0.13 ²⁾
糖耐康	1.67	125.60±42.66	6	2.26±1.26 ^{2,3)}	0.43±0.15 ²⁾
	6.56	99.54±15.96 ¹⁾	6	4.32±1.17 ²⁾	0.61±0.24 ²⁾

4 讨论

4.1 胰岛素抵抗的分子学基础 胰岛素生理效应的发挥是靠其与靶细胞膜表面的胰岛素受体结合, 期待受体后信号转导, 调节代谢和基因表达而实现。胰岛素信号传递受阻或减弱是导致胰岛素抵抗的根本原因。目前, 其发生主要以受体后水平的变化最为多见^[3,4]。胰岛素到达相应靶组织后, 与其上的胰岛素受体(InsR)α亚单位相结合, 激活其β亚单位的内在激酶活性, 导致 InsR 自磷酸化。磷酸化的 InsR 一方面为其它信号分子提供结合位点, 另一方面其磷酸激酶可致胰岛素受体底物-1(IRS-1)磷酸化。通过酪氨酸磷酸化, 胰岛素受体底物蛋白(IRS)与 PI-3K 的调节亚基 p85 相互作用而激活。该酶催化 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃)产生的增加^[5]。PIP₃通过 3'磷酸酯酶(如 PTEN^[6])或 5'磷酸酯酶(如 SHIP2^[7,8])的去磷酸化, 负性调节 PI3-K 的活性, 通过降解第二信使物质, 从而抑制 GLUT4 的转位。众多研究表明, GLUT4 表达和活性的下降引起骨骼肌和脂肪细胞对葡萄糖摄取、利于减少胰岛素抵抗产生的重要分子基础。

4.2 胰岛素抵抗动物模型研究 KKAy 小鼠是在 KK 小鼠的基础上转入突变毛色基因(ay)而成, 其 ay 基因不仅影响小鼠毛色而且可引起代谢紊乱, 出现肥胖、高血糖、脂质代谢紊乱和高胰岛素血症等代谢异常综合征, 故发病是在遗传易感的基础上加环境因素而诱发^[9,10], 和人类 2 型糖尿病的表现极为相似, 是一种较理想的 2 型糖尿病动物模型。C57BL/6J 小鼠呈黑色, 与 KK 小鼠具有基因同源性而作为正常对照组^[11]。

本研究结果提示, 糖耐康能够有效改善 KKAy 小鼠的空腹血糖水平、空腹血清胰岛素及肿瘤坏死因子-α水平, 对血脂及游离脂肪酸有改善趋势。在胰岛素抵抗受体后信号通路上, 对 PI-3K 和 GluT4 的

mRNA 表达有上调作用, 分析其通过胰岛素信号转导途径之一 PI-3K 途径进而改善胰岛素抵抗状态。但该作用是通过信号转导逐级向下游放大还是个别作用于某一些环节起效, 尚不可知。故应对其他下游信号蛋白, 如胰岛素受体(IR)、胰岛素受体底物(IRS)、蛋白激酶 B(PKB)、磷酸肌醇依赖的蛋白激酶(PDK-1)及糖元合成激酶 3(GSK-3)等进行更深一步研究。

[参考文献]

[1] 周丽斌, 陈明道. 胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物的研究进展[J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 1(6) : 58-59.

[2] 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S. , 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 13(10) : 656.

[3] Quinn L. Mechanisms in the development of type 2 diabetes mellitus[J]. J Cardiovasc Nurs, 2002, 16(31) : 1.

[4] Shao J, Yamashita H, Qiao L, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase redistribution is associated with skeletal muscle insulin resistance in gestational diabetes mellitus [J]. Diabetes, 2002, 51(16) : 19.

[5] Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signaling in insulin sensitive tissues[J]. Acta Physiol. Scand, 2005, 183(3) : 3-12.

[6] Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumor suppressor that functions as a phospholipids phosphatase[J]. Trends Cell Biol, 1999, 9: 125-128.

[7] Pesesse X, Deleu S, De Smedt F, *et al.* Identification of a second SH₂-domain containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239: 697-700.

[8] Habib T, Hejna JA, Moses RE, *et al.* Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the SHIP2 protein[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 18605-18609.

[9] 李臣鸿, 邵义舜. 葡萄糖转运子 4 转位信号转导通路的研究进展, 现代生物医学进展[J]. 2006, 6(7) : 54-56.

[10] Watson RT, Khan AH, Furukawa M, *et al.* Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin responsive storage compartment is GGA dependent[J]. EMBO J, 2004, 23(10) : 2059-2070.

[11] Khan AH, Capilla E, Hou JC, *et al.* Entry of Newly Synthesized GLUT4 into the Insulin responsive Storage Compartment is Dependent upon Both the Amino Terminus and the Large Cytoplasmic Loop[J]. J Biol Chem, 2004, 3: 279(36) : 37505-37511.