

金钗石斛生物总碱对糖尿病大鼠血糖及肝脏组织 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达的影响

黄琦^{1,2}, 廖鑫², 吴芹¹, 高琳², 石京山^{1*}

(1. 遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563099;

2. 遵义医学院附属医院内分泌科, 贵州 遵义 563099)

[摘要] **目的:**研究金钗石斛生物总碱(*Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids, DNLA)对糖尿病大鼠血糖及肝脏组织胰岛素受体底物2(IRS-2)mRNA、胰岛素样生长因子1(IGF-1)mRNA表达的影响。**方法:**雄性SD大鼠高脂、高糖饲料喂养大鼠6周后,1次ip链脲佐菌素(STZ)40 mg·kg⁻¹诱导糖尿病大鼠模型。糖尿病大鼠随机分为模型组,二甲双胍组(二甲双胍100 mg·kg⁻¹)和DNLA 20,40,80 mg·kg⁻¹组。另设正常对照组予基础饲料喂养。给药组每日ig给药1次,连续4周,正常组及模型组ig给予等体积的双蒸水。检测大鼠空腹血糖(FPG)空腹胰岛素(FINS),计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),Real time RT-PCR检测大鼠肝脏组织中IRS-2 mRNA,IGF-1 mRNA表达。**结果:**与正常组比较,模型组FPG, FINS, HOMA-IR明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组、DNLA 40,80 mg·kg⁻¹组FPG, FINS, HOMA-IR显著降低($P < 0.05$);与正常组比较,模型组肝脏组织中IRS-2 mRNA,IGF-1 mRNA表达明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组、DNLA 40,80 mg·kg⁻¹组肝脏组织中IRS-2 mRNA,IGF-1 mRNA表达明显增加。**结论:**DNLA能降低糖尿病大鼠血糖,其机制可能与其上调肝脏组织IRS-2 mRNA,IGF-1 mRNA表达,减轻胰岛素抵抗有关。

[关键词] 石斛; 生物碱; 糖尿病; 胰岛素受体底物2; 胰岛素样生长因子1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0155-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190155

Effects of *Dendrobium nobile* Alkaloids on Blood Glucose and Gene Expression of IRS-2 and IGF-1 in Liver of Rats with Diabetes

HUANG Qi^{1,2}, LIAO Xin², WU Qin¹, GAO Lin², SHI Jing-shan^{1*}

(1. Department of Pharmacology and the Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province,

Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated

Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids (DNLA) on blood glucose and gene expression of insulin receptor substrate 2 (IRS-2) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in liver of rats with diabetes. **Method:** Male Sprague-Dawley rats were fed with high-fat diet for 6 weeks. Then streptozotocin (STZ) 40 mg·kg⁻¹ was injected intraperitoneally once to induce diabetic rat model. Diabetic rats were randomly divided into model group, metformin (metformin 100 mg·kg⁻¹) and DNLA 20, 40, 80 mg·kg⁻¹ group. And normal control group was fed with basal feed. After intragastric administration of metformin, DNLA and isopyknic distilled water daily for 4 weeks to rats of metformin group, DNLA group and normal control group respectively, the fasting plasma glucose (FPG) and fasting insulin (FINS) were determined, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were calculated. The expressions of IRS-2 mRNA and IGF-1

[收稿日期] 20140726(010)

[基金项目] 贵州省科技厅中药现代化专项资助(黔科合J字[2005]1001);遵义医学院院基金项目(F-117)

[第一作者] 黄琦,副教授,硕士,从事内分泌药理与临床研究,huangqi001@sina.com

[通讯作者] *石京山,教授,博导,研究方向:内分泌药理学、神经药理学,Phn:86-852-860-9788,E-mail: shijs@zmc.edu.cn

mRNA in liver were determined by real time RT-PCR. **Result:** Compared with the normal control group, the levels of FPG, FINS, HOMA-IR were significantly increased ($P < 0.05$). The FPG, FINS and HOMA-IR were significantly decreased in the metformin group and DNLA 40, 80 mg · kg⁻¹ group compared with those in the model group ($P < 0.05$). Contents of IRS-2 mRNA and IGF-1 mRNA in model group were decreased; compared with model group, contents of IRS-2 mRNA and IGF-1 mRNA in the metformin group and DNLA 40, 80 mg · kg⁻¹ group were increased. **Conclusion:** DNLA can significantly decrease the levels of FPG of diabetic rats, and its mechanism may be related with enhancing the expressional levels of IRS-2 mRNA and IGF-1 mRNA in liver, improvement of insulin resistance.

[**Key words**] *Dendrobium loddigesii*; alkaloids; diabetes mellitus; insulin receptor substrate 2; insulin-like growth factor 1

随着人们生活方式的改变,糖尿病已成为威胁人类健康的全球性公共卫生问题。中华医学会糖尿病分会在《新英格兰医学杂志》发表的中国糖尿病患病率调查结果显示^[1],目前 20 岁以上的人群中,年龄标化的糖尿病患病率为 9.7%,总患病人数达 9200 万以上,中国已经成为全球糖尿病患者最多的国家。金钗石斛为兰科石斛属多年生附生草本植物,有生津益胃、清热养阴等功效,金钗石斛生物总碱(*Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids, DNLA)是其主要药用成分之一。前期研究发现 DNLA 对糖尿病大鼠血糖有改善作用,为进一步探讨其机制,本研究观察 DNLA 对糖尿病大鼠血糖及肝脏组织胰岛素受体底物 2(IRS-2)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1) mRNA 表达影响。

1 材料

1.1 动物和饲料 清洁级雄性 SD 大鼠,体重 160 ~ 180 g,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2007-017。基础饲料营养成分比例:碳水化合物热卡占 55%,脂肪热卡占 10%,蛋白质热卡占 35%;高脂、高糖饲料配比参照文献^[2-3]的方法改良,其营养成分比例:碳水化合物热卡占 42%,脂肪热卡占 40%,蛋白热卡占 18%。

1.2 药品和试剂 DNLA(兰科金钗石斛, *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids)由贵州省中科院天然产物化学重点实验室从贵州省遵义赤水市产金钗石斛醇提法获得,浓硫酸显色法鉴定 DNLA 质量分数 > 98%。链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,批号 015K1235),盐酸二甲双胍片(贵州天安药业公司,批号 20080523),大鼠超敏胰岛素放免试剂盒(美国 LINCO 公司,批号 174563098),Power SYBR Green PCR Master Mix(批号 BK2407),Prime ScriptTM RT reagent Kit(批号 AK2019),RNAiso plus(批号 AK3403)及引物购自 TakaRa 公司。

1.3 仪器 AU2700 型全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司),GAMBYT-CR 型 Y 放免仪(Ger-2010,中国科大中佳公司)。Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),Icycler 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 基础饲料适应性饲养 1 周后,按体重随机分为 2 组:正常对照组 10 只,继续普通饲料饲养;糖尿病组 60 只,给予高脂、高糖饲料饲养。糖尿病组大鼠饲养 6 周后,禁食 8 h,腹腔注射链尿佐菌素 40 mg · kg⁻¹(由 pH 4.4 的 0.1 mol · L⁻¹ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制)。注射后第 3 日禁食 8 h,剪尾取血,筛选出血糖 ≥ 11.1 mmol · L⁻¹ 的大鼠,继续每日测定空腹血糖(FPG),选取持续保持上述标准 1 周不变者定为造模成功。糖尿病造模成功 50 只,随机分为 5 组:模型组、二甲双胍组(二甲双胍 100 mg · kg⁻¹)和 DNLA 20, 40, 80 mg · kg⁻¹组,每组 10 只,继续高脂、高糖饲料饲养。给药组每日 ig 给药 1 次,连续 4 周,正常对照组及模型组 ig 给予等体积的双蒸水。

2.2 检测项目

2.2.1 一般情况 观察大鼠食欲、行为、毛发等情况。

2.2.2 空腹血糖、空腹胰岛素及 HOMA-IR 最后 1 次给药后禁食 8 h,将各组大鼠断尾取血,采用全自动血生化分析仪测定各组大鼠的 FPG 水平,应用放射免疫法测定空腹胰岛素(FINS)。

$$\text{胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)} = \text{FPG} \times \text{FINS} / 22.5$$

2.2.3 Real time RT-PCR 测定肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达 引物设计 β -actin, IRS-2, IGF-1 根据 GeneBank 提供的基因序列,由 TaKaRa 生物工程公司合成。引物序列 β -actin: 5'-GGC-CAACCGTGAAAAGATGA-3', 5'-CAGCCTGGATGGC-

TACGTACA-3'; IRS-2: 5'-AGTGTCCCCATCCTTT-GCTC-3',5'-GCTGTTGCTTCACTGCTTTT-3';IGF-1: 5'-CTGCCTGGGTGTCCAAATGTAAC-3', 5'-TGGG-TATTATGAGGCCGAAGTGA-3'。PCR 反应体系为 25 μ L,第一步,95 $^{\circ}$ C \times 3 min;第二步,95 $^{\circ}$ C \times 10 s,退火温度 \times 1 min,循环 40 次。结果采用相对定量法进行分析处理。

2.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 13.0 统计学软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为有显著差异。

3 结果

3.1 一般情况 造模后,糖尿病大鼠出现精神萎靡、皮毛松乱无光泽和多尿、多饮、多食表现。二甲双胍组及 DNLA 40,80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠较模型组症状改善。

3.2 空腹血糖、空腹胰岛素及 HOMA-IR 与正常组比较,模型组 FPG, FINS, HOMA-IR 明显升高($P < 0.05$)。DNLA 40,80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和二甲双胍组 FPG, FINS, HOMA-IR 低于模型组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 金钗石斛生物总碱对糖尿病大鼠空腹血糖、空腹胰岛素及 HOMA-IR 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	空腹血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		FINS $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	HOMA-IR
		给药前	给药后		
正常	-	5.05 \pm 0.72	5.11 \pm 0.78	41.3 \pm 7.8	0.26 \pm 0.09
模型	-	24.62(6.32 ¹⁾	25.01 \pm 5.45 ¹⁾	58.7 \pm 7.6 ¹⁾	1.59 \pm 0.18 ¹⁾
二甲双胍	100	25.45(5.60)	8.23 \pm 3.68 ²⁾	45.8 \pm 6.2 ²⁾	0.36 \pm 0.19 ²⁾
DNLA	20	23.90(5.56)	21.39 \pm 6.54	59.3 \pm 8.9	1.42 \pm 0.28
	40	25.43(4.89)	12.75 \pm 5.87 ²⁾	41.5 \pm 8.5 ²⁾	0.49 \pm 0.19 ²⁾
	80	24.12(5.83)	9.35 \pm 4.81 ²⁾	40.9 \pm 9.7 ²⁾	0.29 \pm 0.13 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 Real time PCR 检测大鼠肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达 模型组大鼠肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达明显减少($P < 0.05$);二甲双胍组, DNLA 40,80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显上调模型大鼠肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 金钗石斛生物总碱对糖尿病大鼠肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IRS-2 mRNA	IGF-1 mRNA
		$/\%$	$/\%$
正常	-	100.0 \pm 7.8	100.0 \pm 3.4
模型	-	35.7 \pm 4.2 ¹⁾	35.5 \pm 14.1 ¹⁾
二甲双胍	100	80.7 \pm 15.6 ²⁾	88.4 \pm 6.4 ²⁾
DNLA	20	62.5 \pm 20.9	63.5 \pm 8.7
	40	64.8 \pm 9.4 ²⁾	97.2 \pm 13.3 ²⁾
	80	68.4 \pm 9.4 ²⁾	95.6 \pm 14.8 ²⁾

4 讨论

2 型糖尿病通常存在胰岛素抵抗及胰岛素相对缺乏,高胰岛素血症是胰岛素抵抗的最经典的标志。实验表明将正常大鼠的血浆胰岛素水平升高 7 d 可导致胰岛素介导的葡萄糖摄取功能受损^[4]。目前流行病学研究主要用 FPG 及 FINS 来推算胰岛素抵

抗,近年应用最广的是 HOMA-IR 公式^[5-6]。在本研究中,给予高脂高糖饲料喂养及腹腔注射链脲佐菌素后,大鼠 FPG, FINS, HOMA-IR 均显著增高,与文献报道相符合^[7-8]。

胰岛素受体底物(IRS)属于细胞质中的接头蛋白,主要连接胰岛素受体和多种效应分子,从而介导细胞对胰岛素等的反应。Withers 等用基因敲除的方法发现敲除 IRS-2 基因的大鼠表现出严重的胰岛素抵抗、胰岛素分泌障碍,以及明显的糖尿病症状^[9]。胰岛素样生长因子(IGF)属肽类家族激素,结构和功能与胰岛素相似,循环中的 IGF-1 主要来源于肝间质细胞。BioBreeding/Worcester (BB/W) 糖尿病大鼠同时存在胰岛素缺乏和胰岛素抵抗,IGF-1 能有效降低其血糖,其机制部分可能由于减少肝糖产生所致^[10]。

本研究采用金钗石斛,其小分子化学成分以石斛碱、石斛次碱等倍半萜类生物碱为主,生物总碱含量达到 0.4% ~ 0.6%^[11-12]。前期研究已发现 DNLA 可改善糖尿病大鼠糖代谢,进一步的研究显示高脂、高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素导致大鼠血糖及胰岛素水平升高,形成胰岛素抵抗,肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达减少,而 DNLA 可降低糖尿病大鼠空腹血糖、空腹胰岛素,同时上调糖尿病大

鼠肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达。

综上所述, DNLA 40, 80 mg·kg⁻¹对高脂、高糖加链尿佐菌素诱导糖尿病模型大鼠 FPG 有明显降低作用, 其作用机制至少与通过上调肝脏组织中 IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA 表达, 从而减轻胰岛素抵抗有关。

[参考文献]

[1] Yang W, Lu J, Weng J P, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12):1090.

[2] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4):313.

[3] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链尿佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(3):154.

[4] Koopmans S J, Ohman L, Haywood J R, et al. Seven days of euglycemic hyperinsulinemia induces insulin resistance for glucose metabolism but not hypertension, elevated catecholamine levels, or increased sodium retention in conscious normal rat [J]. *Diabetes*, 1997,

46(10):1572.

[5] 张家庆. 新的 HOMA-IR--从空腹血糖、空腹胰岛素测胰岛素抵抗 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2005, 13(4):245.

[6] 李宝毅, 谢云. HOMA 评估法及其研究进展 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(2):126.

[7] 宋玉萍, 韩冲, 史婧丽, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 SIRT3 表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29(5):427.

[8] 周才杰, 黄鸣清, 陈长青, 等. 丹酚酸 B 改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13):233.

[9] Withers D J, Gutierrez J S, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice [J]. *Nature*, 1998, 391(6670):900.

[10] Jacob R J, Sherwin R S, Bowen L, et al. Metabolic effects of IGF-1 and insulin in spontaneously diabetic BB/w rats [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(2):E262.

[11] 徐宁. 石斛中总生物碱的含量测定方法研究 [J]. *基层中药杂志*, 2001, 15(3):24.

[12] 李亚芳, 张晓华, 孙国明. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定 [J]. *中国药事*, 2002, 16(7):426.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn