

丹蛭降糖胶囊改善肥胖大鼠骨骼肌胰岛素抵抗机制的初步研究

刘伟¹, 陈明卫^{1*}, 童俊露¹, 方朝晖², 夏同佳¹, 王佑民¹

(1. 安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230032;

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] **目的:**探讨丹蛭降糖胶囊对高脂饮食诱导的肥胖大鼠骨骼肌脂联素(APN),脂联素受体结合蛋白(APPL1)及葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)表达的影响。**方法:**雄性SD大鼠随机分为普通饮食组(NC组)、单纯高脂饮食组(HF组)、高脂饮食+丹蛭降糖胶囊组(FD组,470 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、高脂饮食+吡格列酮组(PIO组,10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、高脂饮食+丹蛭降糖胶囊联合吡格列酮组(FD/PIO组,丹蛭降糖胶囊470 mg·kg⁻¹·d⁻¹+吡格列酮10 mg·kg⁻¹·d⁻¹),ig给药4周。NC组继续普通饲料喂养,给予蒸馏水ig。应用全自动生化分析仪测定骨骼肌甘油三酯(TG)含量;免疫组化及Western blot检测APN, APPL1, GLUT4在骨骼肌组织中的定位以及蛋白表达。**结果:**①HF组骨骼肌内TG含量显著高于NC组($P < 0.01$)。相较于HF组,各干预组大鼠骨骼肌TG含量均明显下降($P < 0.05$)。②免疫组化以及Western blot检测结果显示,HF组APN, APPL1, GLUT4表达较NC组明显降低($P < 0.05$);各干预组APN, APPL1, GLUT4表达均较HF组明显增加($P < 0.05$)。③相关分析发现,大鼠骨骼肌TG含量与HOMA-IR呈正相关($r = 0.63, P < 0.01$),与APN, APPL1, GLUT4蛋白均呈负相关(r 分别为-0.57, -0.51, -0.62,均 $P < 0.01$);HOMA-IR与APN, APPL1, GLUT4蛋白均呈负相关(r 分别为-0.49, -0.44, -0.52,均 $P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**丹蛭降糖胶囊可减轻骨骼肌脂质沉积,上调骨骼肌组织中的APN, APPL1, GLUT4表达,从而改善骨骼肌胰岛素抵抗。

[关键词] 肥胖; 骨骼肌; 脂联素; 脂联素受体结合蛋白; 丹蛭降糖胶囊

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0151-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220151

A Pilot Study on Mechanisms of Danzhi Jiangtang Capsule in Improvement of Skeletal Insulin Resistance in Obese Rats

LIU Wei¹, CHEN Ming-wei^{1*}, TONG Jun-lu¹, FANG Zhang-hui², XIA Tong-jia¹, WANG You-min¹

(1. First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

(2. First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Danzhi Jiangtang capsule on protein expression of adiponectin (APN), adaptor protein containing PH domain, PTB domain and leucine zipper motif1 (APPL1) and glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle in obese rats fed with high-fat diet. **Method:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into basal diet group (NC group), untreated high-fat diet group (HF group), high-fat diet plus Danzhi Jiangtang capsule (FD group, 470 mg·kg⁻¹·d⁻¹), high-fat diet plus pioglitazone (PIO group, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹), high-fat diet plus Danzhi Jiangtang capsule and pioglitazone (FD/PIO group, 470 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for Danzhi Jiangtang capsule plus 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for pioglitazone). These treatment drugs were added to

[收稿日期] 20140504(023)

[基金项目] 国家中医临床研究基地专项课题(JDZX2012005)

[第一作者] 刘伟,在读硕士,主治医师,从事代谢性肾病研究,Tel:0551-62922037,E-mail:13856901560@163.com

[通讯作者] *陈明卫,博士,副教授,从事肥胖发病机制研究,Tel:0551-62922069,E-mail:chmw1@163.com

the animals by intragastric administration for 4 weeks. The animals in NC group continued to be given the basal diet and distilled water by intragastric administration. The contents of triglyceride in skeletal muscle were measured by automatic biochemical analyzer, and protein expression of APN, APPL1 and GLUT4 were determined by immunohistochemistry and Western blot analysis, respectively. **Result:** ①The contents of triglyceride in skeletal muscle were significantly higher in HF group than in NC group ($P < 0.01$). Compared with HF group, The contents of triglyceride in skeletal muscle in each intervention group were reduced significantly ($P < 0.05$). ②Immunohistochemistry and Western blot analysis revealed that protein expression of APN, APPL1 and GLUT4 in skeletal muscle in HF group were significantly lower than in NC group ($P < 0.05$). Compared with HF group, The APN, APPL1 and GLUT4 expression in skeletal muscle in each intervention group were increased significantly ($P < 0.05$). ③Pearson correlation analysis showed that the contents of triglyceride in skeletal muscle were positive correlated with HOMA-IR ($r = 0.63$, $P < 0.01$). By contrast, the contents of triglyceride in skeletal muscle were negative correlated with protein expression of APN, APPL1 and GLUT4 ($r = -0.57$, -0.51 , -0.62 , respectively, all $P < 0.01$). In addition, HOMA-IR was negative correlated with protein expression of APN, APPL1 and GLUT4 ($r = -0.57$, -0.51 , -0.62 , respectively, all $P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Danzhi Jiangtang capsule can upregulate the expression of APN, APPL1 and GLUT4 in skeletal muscle of obese rats, reduce lipid deposition in skeletal muscle, thus improve skeletal insulin resistance.

[Key words] obese; skeletal muscle; adiponectin; adaptor protein containing PH domain PTB domain and leucine zipper motif1; Danzhi Jiangtang capsule

脂联素 (APN) 是 20 世纪 90 年代首先在脂肪组织中被发现的具有胰岛素增敏效应的脂肪因子。近年来研究表明, APN 亦可在非脂肪组织如骨骼肌组织中表达分泌, 这种骨骼肌源性 APN 同样具有调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗 (IR)、促进脂肪酸氧化的效应^[1]。而在 APN 介导的代谢相关的信号通路中, 脂联素受体结合蛋白 (APPL1) 起着重要的作用^[2]。目前普遍认为, 骨骼肌细胞内脂肪酸和甘油三酯 (TG) 积聚, 可导致骨骼肌 IR 的发生^[3], 部分机制可能与骨骼肌组织脂肪异位沉积降低 APN, APPL1 表达, 导致 APN-APPL1 信号通路受损有关^[4-5]。

研究发现, 噻唑烷二酮类药物 (TZD) 可增加骨骼肌细胞中 APN 以及葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 表达^[6-7], 发挥胰岛素增敏效应。但中医药对 APN-APPL1 信号通路的影响尚未有相关报道。笔者的前期研究表明, 丹蛭降糖胶囊可提高肥胖模型大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达, 具体机制尚不清楚^[8]。本实验通过高脂饲料喂养 SD 大鼠建立营养性肥胖大鼠模型, 并应用丹蛭降糖胶囊进行干预研究, 观察其对骨骼肌脂质沉积以及 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物与饲料 清洁级 4 周龄 60 只雄性 SD 大鼠, 体重 (150 ± 30) g, 购自安立实验动物公司, 合格

证号 SCXK(苏)2002-00002。基础饲料及高脂饲料均由安徽医科大学实验动物中心配制。基础饲料: 脂肪占 13%, 蛋白质占 21%, 碳水化合物占 66%。高脂饲料: 配伍构成为普通饲料 55%, 猪油 12%, 蔗糖 5%, 奶粉 8%, 花生 5%, 鸡蛋 10%, 麻油 3%, 食盐 2%, 其中蛋白质, 脂肪, 碳水化合物提供的能量分别占 16%, 59% 和 25%。

1.2 药物与试剂 丹蛭降糖胶囊为安徽中医药大学第一附属医院院内制剂, 由药物制剂中心生产 (批号 030125), 制备工艺为: 取太子参 1 000 g, 地黄 800 g, 牡丹皮 800 g, 泽泻 600 g, 菟丝子 400 g, 水蛭 100 g, 6 味药材饮片加水浸泡 0.5 h, 煎煮提取 3 次, 第 1 次加 10 倍量水煎煮 1.5 h, 第 2, 3 次加 8 倍量水煎煮提取 1 h。合并提取液过滤, 减压浓缩至 4:1, 加入 1% 壳聚糖醋水溶液搅匀, 冷藏静置絮凝 24 h, 减压过滤, 滤液真空浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.10 (60 ℃), 喷雾制粒, 干燥整粒, 充填抛光, 包装成 1 000 粒胶囊。质检指标结论: 按本品制剂质量标准草案和《中国药典》2000 年版一部附录 X IIC 微生物限度检查检验均符合规定。每粒胶囊含提取物 0.5 g^[9]。盐酸吡格列酮片 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 H20040631)。鼠胰岛素放免试剂盒 (北京北方生物研究所产品, 批号 S10930046)。甘油三酯 (TG) 试剂盒 (南京建成生物研究所产品, 批号 F001-1)。兔抗鼠 APPL1 抗体、兔抗鼠 GLUT4 抗

体、兔抗鼠脂联素抗体(均购自美国 Bioworld 公司,批号 BS80215)。山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体、DAB 显色试剂盒(均购自北京中杉金桥生物有限公司,批号 ZA0304)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、山羊抗兔二抗、兔抗鼠二抗(均购自碧云天生物技术有限公司,批号 P0012)。

1.3 仪器 强生稳步倍加型血糖仪及配套试纸(美国强生公司),P800 型全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司),倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),RM2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司),凝胶成像系统(中国珠海黑马有限公司)。

2 方法

2.1 肥胖大鼠模型的建立 4 周龄雄性 SD 大鼠造模前先用基础饲料适应性喂养 1 周。明暗周期 12/12 h,自由摄食、饮水,随机挑选 10 只大鼠作为普通饮食对照组(NC 组),给予普通饲料喂养,至实验结束。其余 50 只给予高脂饲料喂养,作为高脂饮食组(HD 组)。12 周后以 HD 组大鼠体重超过 NC 组大鼠平均体重 20% 为标准来确定肥胖大鼠造模成功^[10]。共 40 只大鼠符合肥胖模型的要求。

2.2 分组与给药 40 只符合肥胖模型的大鼠按体重再随机分为高脂对照组(HF 组)、高脂+丹蛭降糖胶囊组(FD 组)、高脂+吡格列酮组(PIO 组)、高脂+丹蛭降糖胶囊联合吡格列酮组(FD+PIO 组)各 10 只,继续高脂饮食,同时每组分别给予溶媒 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹,丹蛭降糖胶囊 470 mg·kg⁻¹·d⁻¹,吡格列酮 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹,丹蛭降糖胶囊 470 mg·kg⁻¹·d⁻¹+吡格列酮 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig。NC 组继续普通饲料喂养,给予蒸馏水 ig。治疗持续时间 4 周。

2.3 标本收集 16 周时 5 组大鼠禁食过夜 8 h 后,以 10% 水合氯醛麻醉,麻醉状态下准确称取体重,下腔静脉取血,分离血清,-80 °C 冰箱中以备各项生化指标的测定;迅速分离附睾及肾周脂肪,称取内脏脂肪质量;随后分离大鼠股四头肌组织,置于液氮罐中保存以备提取 TG。

2.4 血液生化指标检测 强生稳步倍加型血糖仪及配套试纸检测空腹血糖(FBG)。全自动生化分析仪检测血清 TG、胆固醇(TC)。放射免疫法检测空腹血清胰岛素(FINS)。铜显色法测定血游离脂肪酸(FFA)。

胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)

$$= \text{FINS}(\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{FBG}(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) / 22.5$$

腹脂指数 = [肾周及附睾脂肪质量(g)/体重(g)] × 100

2.5 骨骼肌中 TG(IMTG) 含量的测定 剪取 100 mg 大鼠骨骼肌组织,制备骨骼肌匀浆^[11]。应用全自动生化分析仪测定骨骼肌匀浆中 IMTG 含量。

2.6 检测肌肉组织中 APN, APPL1, GLUT4 的表达 骨骼肌石蜡切片经脱蜡后,在阻断内源性过氧化物酶以及封闭非特异性背景染色后,分别加入兔抗鼠 APN 一抗(1:300),GLUT4 一抗(1:300),APPL1 一抗(1:500),4 °C 孵育过夜杂交,PBS 冲洗 3 次。再加入山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体(二抗试剂),37 °C 孵育杂交,PBS 冲洗 3 次。DAB 显色,苏木精复染,脱水、干燥、封片后显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为空白对照。结果判定:切片中棕黄色、褐色颗粒为阳性结果。在 400 倍视野下采集图像,Image-Pro Plus 6.0 软件处理结果,以平均吸光度(A)表示 APPL1,GLUT4 的相对强度。

2.7 检测骨骼肌组织中 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达 取 100 mg 骨骼肌组织制成匀浆,4 °C 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,按 BCA 法测定蛋白浓度。提取蛋白经 100 °C,5 min 变性后上样,电泳,转膜,封闭。加入 APN,APPL1,GLUT4 蛋白一抗,孵育过夜。第 2 天加入二抗孵育 2 h,ECL 显影。Western blot 所得的条带经扫描转换成图片,用图像处理系统分析目标条带灰度值。肌肉组织中 APN,APPL1,GLUT4 蛋白含量与自身 GAPDH 的比值作为各目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 方法,相关性分析采用 Pearson 检验。显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠体重、摄食量、腹脂指数的比较 与 NC 组相比,HF 组、FD 组、PIO 组、FD/PIO 组大鼠体重、摄食量、腹脂指数均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 HF 组、FD 组、PIO 组、FD/PIO 组 4 组间大鼠体重、摄食量、腹脂指数均无显著差异。见表 1。

3.2 各组大鼠生化指标、HOMA-IR 和 IMTG 含量的比较 与 NC 组相比,HF 组的 FBG, FINS, TG, TC, HOMA-IR, FFA, IMTG 含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 HF 组相比,PIO 组、FD/PIO 组的 FBG, FINS, TG, HOMA-IR, FFA, 骨骼肌 TG 含量均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 TC 则无显著差异;与 HF 组相比,FD 组的 IMTG 含量明显下降

表 1 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠体重、摄食量、腹脂指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g	摄食量/g	腹脂指数
普通饲料	-	359 ± 40	30 ± 7	3.31 ± 0.58
高脂饲料	-	462 ± 53 ²⁾	21 ± 8 ¹⁾	4.18 ± 0.83 ¹⁾
丹蛭降糖胶囊	470	458 ± 50 ²⁾	19 ± 7 ¹⁾	4.09 ± 0.76 ¹⁾
吡格列酮	10	454 ± 56 ²⁾	18 ± 8 ¹⁾	3.96 ± 0.86 ¹⁾
丹蛭降糖胶囊 + 吡格列酮	470 + 10	453 ± 54 ²⁾	17 ± 9 ¹⁾	4.11 ± 0.81 ¹⁾

注:与普通饲料组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

($P < 0.05$), 而 FBG, FINS, TG, TC, HOMA-IR, FFA 组、FD/PIO 组 3 组间生化指标、HOMA-IR 和 IMTG 有所降低, 但均无统计学差异。此外, FD 组、PIO 含量均无显著差异。见表 2。

表 2 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠生化指标、HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	药物剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	FBG / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FINS / $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$	TG / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TC / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HOMA-IR	FFA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IMTG / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
普通饲料	-	5.10 ± 0.92	13 ± 4	0.44 ± 0.85	1.36 ± 0.27	2.91 ± 0.88	328 ± 39	1.93 ± 0.65
高脂饲料	-	6.81 ± 2.11 ²⁾	39 ± 11 ²⁾	0.97 ± 0.69 ²⁾	1.88 ± 0.21 ¹⁾	10.96 ± 3.57 ²⁾	472 ± 48 ²⁾	2.96 ± 1.63 ²⁾
丹蛭降糖胶囊	470	6.57 ± 1.48 ²⁾	34 ± 10 ²⁾	0.94 ± 0.72 ²⁾	1.87 ± 0.24 ¹⁾	9.78 ± 3.04 ²⁾	455 ± 43 ¹⁾	2.66 ± 1.58 ^{1,3)}
吡格列酮	10	6.12 ± 1.53 ^{2,3)}	19 ± 8 ⁴⁾	0.79 ± 0.58 ^{2,3)}	1.88 ± 0.26 ¹⁾	5.43 ± 1.58 ^{1,4)}	419 ± 33 ^{1,3)}	2.42 ± 1.61 ^{1,3)}
丹蛭降糖胶囊 + 吡格列酮	470 + 10	5.96 ± 1.57 ^{1,4)}	16 ± 10 ⁴⁾	0.81 ± 0.62 ^{2,3)}	1.87 ± 0.25 ¹⁾	4.41 ± 2.06 ^{1,4)}	403 ± 30 ^{1,4)}	2.31 ± 1.49 ^{1,3)}

注:IMTG 为骨骼肌匀浆测定的骨骼肌细胞 TG 含量;与普通饲料组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与高脂饲料组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

3.3 各组大鼠间骨骼肌 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达的比较 APN, APPL1 和 GLUT4 均在肌肉组织中广泛表达, APN 和 APPL1 蛋白主要分布在胞膜, 部分在胞质表达, GLUT4 分布在胞膜和细胞间。HF 组中 APN, APPL1 和 GLUT4 蛋白的阳性表达较 NC 组明显降低 ($P < 0.05$)。相较于 HF 组, 各干预组

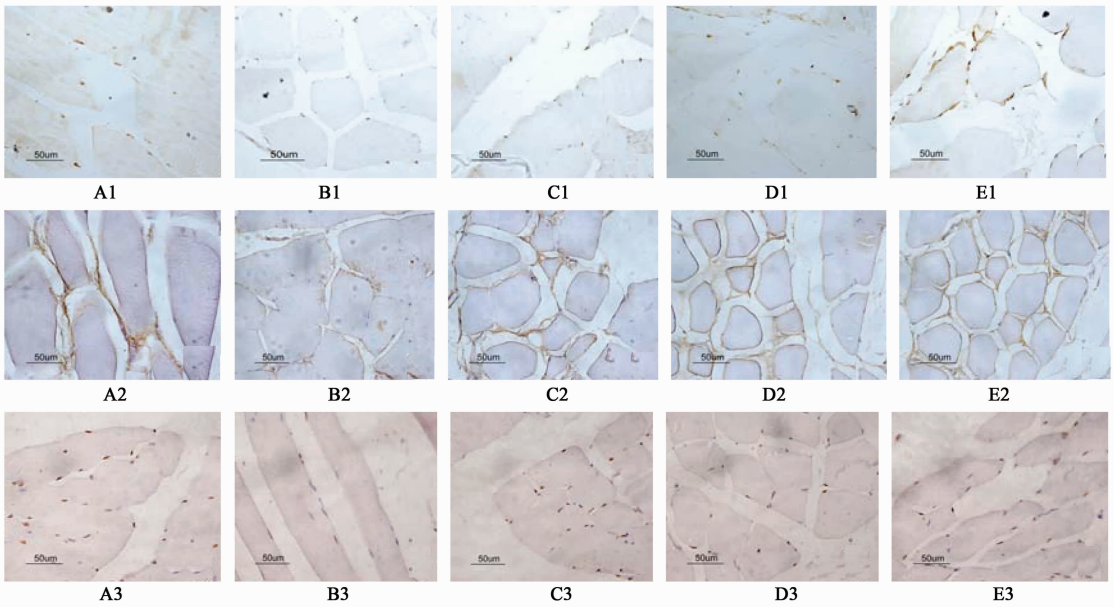
骨骼肌中 APN, APPL1 和 GLUT4 蛋白表达均明显增高 ($P < 0.05$), FD/PIO 组上调效果最明显, 其次是 PIO 组, FD 组上调作用相对最小。见表 3, 图 1。Western Blot 检测各组大鼠骨骼肌 APN, APPL1 和 GLUT4 蛋白的表达, 与免疫组化光密度值结果基本一致。见表 4, 图 2。

表 3 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠骨骼肌组织 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达 (A) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	药物剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	APN	APPL1	GLUT4
普通饲料	-	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.02
高脂饲料	-	0.09 ± 0.02 ²⁾	0.13 ± 0.01 ²⁾	0.15 ± 0.01 ²⁾
丹蛭降糖胶囊	470	0.13 ± 0.02 ³⁾	0.16 ± 0.03 ³⁾	0.18 ± 0.03 ³⁾
吡格列酮	10	0.15 ± 0.02 ³⁾	0.18 ± 0.02 ³⁾	0.22 ± 0.02 ³⁾
丹蛭降糖胶囊 + 吡格列酮	470 + 10	0.18 ± 0.03 ⁴⁾	0.20 ± 0.03 ⁴⁾	0.24 ± 0.03 ⁴⁾

表 4 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠骨骼肌组织 APN, APPL1, GLUT4 蛋白相对表达 (A) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	APN/GAPDH	APPL1/GAPDH	GLUT4/GAPDH
普通饲料	-	0.76 ± 0.06	0.81 ± 0.09	1.19 ± 0.16
高脂饲料	-	0.44 ± 0.04 ²⁾	0.39 ± 0.05 ²⁾	0.68 ± 0.08 ²⁾
丹蛭降糖胶囊	470	0.54 ± 0.05 ³⁾	0.62 ± 0.04 ³⁾	0.82 ± 0.11 ³⁾
吡格列酮	10	0.61 ± 0.03 ³⁾	0.71 ± 0.06 ³⁾	1.02 ± 0.10 ³⁾
丹蛭降糖胶囊 + 吡格列酮	470 + 10	0.71 ± 0.04 ⁴⁾	0.78 ± 0.08 ⁴⁾	1.13 ± 0.14 ⁴⁾



A. 普通饲料组;B. 高脂饲料组;C. 丹蛭降糖胶囊 $470 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 吡格列酮 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
E. 丹蛭降糖胶囊 $470 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 吡格列酮 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)
1. APPL1 的阳性表达;2. GLUT4 的阳性表达;3. APN 的阳性表达

图 1 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠骨骼肌组织中 APPL1, GLUT4, APN 蛋白表达的影响(SP, $\times 400$)

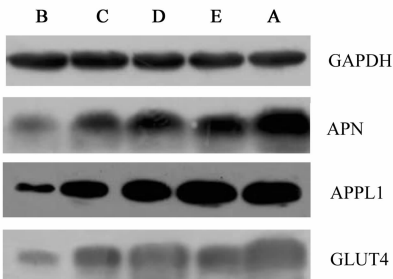


图 2 丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠骨骼肌组织中 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达的影响

3.4 APN, APPL1, GLUT4, HOMA-IR, 骨骼肌内 TG 含量相互间相关性分析 相关分析发现,大鼠 IMTG 与 HOMA-IR 呈正相关 ($r = 0.63, P < 0.01$), 与 APN, APPL1, GLUT4 蛋白均呈负相关 (r 分别为 $-0.57, -0.51, -0.62$, 均 $P < 0.01$); HOMA-IR 与 APN, APPL1, GLUT4 蛋白均呈负相关 (r 分别为 $-0.49, -0.44, -0.52$, 均 $P < 0.05, P < 0.01$)。

4 讨论

高脂诱导的 SD 肥胖大鼠与人类肥胖的发生过程和表现非常相似,是较理想的营养性肥胖研究模型。本研究发现,与普通饮食组大鼠相比,高脂饮食组肥胖大鼠的内脏脂肪明显增加,糖脂代谢紊乱更加明显,胰岛素抵抗程度加重,与笔者先前的研究发现一致^[12]。此外,本研究还发现,高脂饮食组大鼠骨骼肌中 TG 的含量明显增高, TG 含量与反映 IR

程度的指标 HOMA-IR 呈正相关。表明在高脂环境诱导的肥胖个体中,骨骼肌中脂质沉积增加可能与 IR 发生存在内在联系^[10]。

大量研究证实,骨骼肌源性 APN 作为骨骼肌因子之一,可通过自分泌的方式在骨骼肌中表达和分泌^[4,13-14]。APPL1 是一种具有多个结构域的受体结合蛋白,可与 APN 受体 (APNR) 结合,在 APN 信号转导过程中起着重要作用^[2]。研究发现 APN-APNR-APPL1 信号通路的活化对提高骨骼肌细胞脂肪酸 β 氧化以及葡萄糖摄取能力,进而改善 IR 发挥重要的作用^[5]。本研究应用免疫组化的方法证实大鼠骨骼肌组织中存在 APN 的表达,并且主要分布于骨骼肌的细胞膜上。与文献报道基本一致^[4,14]。此外,本组资料还显示,与普通饮食组大鼠相比,高脂饮食组肥胖大鼠骨骼肌中 APN, APPL1, GLUT4 蛋白的表达显著降低。相关分析发现,大鼠 IMTG 与 APN, APPL1, GLUT4 蛋白均呈负相关, HOMA-IR 与 APN, APPL1, GLUT4 蛋白均呈负相关。表明骨骼肌脂肪异位沉积可能会下调骨骼肌中 APN-APNR-APPL1 信号通路蛋白表达,从而导致骨骼肌组织对葡萄糖利用减少,诱导骨骼肌 IR 的发生。Krause MP 等研究发现^[4],骨骼肌细胞 APN 的表达与肌细胞内脂质的含量关系密切。支持本研究结果。

研究已发现, TZD 可直接作用于大鼠骨骼肌 L6 细胞内过氧化物增殖体激活受体- γ (PPAR- γ), 从而

增加骨骼肌细胞 APN 以及 GLUT4 的表达^[6-7]。在本实验中,与单纯高脂饮食组大鼠相比,应用 TZD 类药物吡格列酮干预的 PIO 组肥胖大鼠血中 FFA 水平、骨骼肌内 TG 含量以及 HOMA-IR 明显降低,而骨骼肌内 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达均显著增加。表明 PIO 可通过增加骨骼肌细胞 FFA 的摄取和氧化代谢能力,降低外周血中 FFA 的浓度以及骨骼肌中 TG 含量,活化 APN-APNR-APPL1 信号通路,从而改善骨骼肌 IR。这与 Cleasby M E 等报道结果相似^[5]。丹蛭降糖胶囊是由太子参、丹皮、生地黄、泽泻、菟丝子、水蛭组成的复方制剂。研究表明它可提高肥胖大鼠网膜脂肪组织中 PPAR- γ 以及骨骼肌中葡萄糖转运体 4 mRNA 表达,具有改善糖脂代谢以及 IR 等功效^[8-9]。本研究结果进一步证实丹蛭降糖胶囊对肥胖大鼠糖脂代谢以及 IR 的改善效应。另一方面,还发现与单纯高脂饮食组大鼠相比,应用丹蛭降糖胶囊干预的 FD 组肥胖大鼠骨骼肌内 TG 含量显著降低,骨骼肌 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达显著增加,提示丹蛭降糖胶囊具有改善肥胖大鼠骨骼肌脂质沉积,上调骨骼肌中 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达作用。然而这种作用要弱于吡格列酮。本研究结果将为揭示丹蛭降糖胶囊改善糖脂代谢以及 IR 等功效,提供了一个新的机制认识。此外,本组资料还显示,联合应用吡格列酮和丹蛭降糖胶囊对改善肥胖大鼠骨骼肌脂质沉积、IR 以及上调骨骼肌中 APN, APPL1, GLUT4 蛋白表达具有协同效应。

总之,本研究发现丹蛭降糖胶囊可上调肥胖大鼠骨骼肌细胞 APN, APPL1, GLUT4 的表达,降低骨骼肌中 TG 的含量,从而改善骨骼肌脂质沉积以及 IR。若与吡格列酮联合应用,上述效应可获得协同增强。

[参考文献]

[1] Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action in skeletal muscle [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28(1):33.
[2] Mao X, Kikani C K, Riojas R A, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(5):516.

[3] Phielix E, Mensink M. Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function [J]. Physiol Behav, 2008, 94(2):252.
[4] Krause M P, Ying Liu, Vivian Vu, et al. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fiber-s and influences muscle phenotype and function [J]. Physiol Cell Physiol, 2008, 295:203.
[5] Cleasby M E, Q Lau, Polkinghorne E, et al. The adaptor protein APPL1 increases glycogen accumulation in rat skeletal muscle through activation of the PI3-kinase signalling pathway [J]. J Endocrinol, 2011, 210(1):81.
[6] 戴尧,陈明卫,方朝晖,等. 吡格列酮对胰岛素抵抗模型 L6 细胞脂联素和 GLUT4 表达的影响及其机制研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2013,29(9):79.
[7] Liu Y, Chewchuk, Lavigne C, et al. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(3):E657.
[8] 方朝晖,鲍陶陶,王开成,等. 丹蛭降糖胶囊对糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌葡萄糖转运体 IV 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(6):32.
[9] 方朝晖,王佑民,王开成,等. 丹蛭降糖胶囊对胰岛素抵抗大鼠 PPAR- γ mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):36.
[10] 谭正怀,莫正纪. 三种肥胖动物模型研究概况[J]. 中国实验动物学杂志,2001,11(3):176.
[11] 陈明卫,夏同佳,方朝晖,等. 丹蛭降糖胶囊改善高脂饮食诱导的肥胖大鼠骨骼肌胰岛素抵抗机制的初步研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2014,8(9):1697.
[12] Chen M, Deng D, Fang Z, et al. Fenofibrate increases serum vaspin by upregulating its expression in adipose tissue [J]. Endocrine, 2014, 45(3):409.
[13] Pedersen B K, Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ; IL-6 and other myokines [J]. J Appl Physiol, 2009,107(4):1006.
[14] Yang B, Chen L, Qian Y, et al. Changes of skeletal muscle adiponectin content in diet-induced insulin resistant rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(1):209.

[责任编辑 聂淑琴]