

# 金匮肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体表达的影响

张捷平, 秦崇涛, 余文珍, 宋礼平, 施红\*

(福建中医药大学, 福州 350122)

**[摘要]** **目的:**探讨金匮肾气丸(Jinkui Shenqi Wan, JKSQ)对糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体(insulin receptor, InsR)基因表达的影响,阐明其降低血糖的分子机制。**方法:**6周龄的SPF级雄性SD大鼠高脂高糖饲料喂养4周后,腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病模型。4d后模型大鼠随机分成模型组、二甲双胍组、JKSQ低、高剂量组。正常组与模型组给予生理盐水,二甲双胍组给予二甲双胍( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),JKSQ低、高剂量组分别给予JKSQ( $10, 20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )灌胃4周。以酶学方法检测各组大鼠骨骼肌的己糖激酶(hexokinase, HK),6-磷酸果糖激酶-1(6-phosphofructokinase-1, PFK)活性,逆转录实时荧光定量PCR及蛋白印迹法检测骨骼肌InsR mRNA及蛋白表达水平变化。**结果:**与正常组比较,模型组出现了HK, PFK活性下降( $P < 0.01$ ), InsR mRNA及蛋白质表达下降( $P < 0.01$ );给药治疗4周后,与模型组相比较,二甲双胍组、JKSQ低、高剂量组HK, PFK活性明显上升( $P < 0.05$ );同时各组InsR mRNA及蛋白质表达量明显提高( $P < 0.05$ )。**结论:**JKSQ能上调2型糖尿病大鼠骨骼肌InsR基因在mRNA及蛋白质的表达,增加HK与PFK活性,促进葡萄糖的氧化利用。

**[关键词]** 金匮肾气丸; 糖尿病; 骨骼肌; 胰岛素受体; 基因表达

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0165-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220165

## Effects of Jinkui Shenqi Wan on Expression of Insulin Receptor of Skeletal Muscle in Rats with Diabetes

ZHANG Jie-ping, QING Chong-tao, YU Wen-zhen, SONG Li-ping, SHI Hong\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Jinkui Shenqi Wan (JKSQ) on insulin receptor (InsR) gene expression in skeletal muscle. **Method:** With 4 weeks fed high fat high sugar diet, male SD SPF rats of 6 weeks were induced diabete by intraperitoneal injection with streptozotocin. After 4 days the model rats were randomly divided into model group, metformin group, JKSQ low dose group and high dose group. The normal group and model group were given physiological saline, metformin group was given metformin ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), JKSQ low dose group and high dose group were given JKSQ ( $10, 20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) by gavage for 4 weeks. Hexokinase (HK), 6-phosphofructokinase-1 (PFK) activity of skeletal muscle were detected. The mRNA and protein expression lever of InsR were detected with RT-PCR and Western blot. **Result:** As compared with normal group, HK and PFK activity decreased in model group ( $P < 0.01$ ), the mRNA and protein expression of InsR were decreased markedly ( $P < 0.01$ ). During 4 weeks with drug treatment, as compared with the model group, medicine HK and PFK activity were significantly increased in positive control group, JKSQ low dose group and high dose group ( $P < 0.05$ ); while each of the above groups InsR expression on mRNA and protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** JKSQ can increase the mRNA and protein lever expression of InsR, and increas HK and PFK activity, to promote the oxidation of glucose utilization in skeletal muscle.

**[Key words]** Jinkui Shenqi Wan; diabetes; skeletal muscle; insulin receptor; gene expression

**[收稿日期]** 20140609(001)

**[基金项目]** 福建省教育厅省属高校专项(JK2010027)

**[第一作者]** 张捷平,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, Tel:0591-22861151, E-mail:zhjieping@163.com

**[通讯作者]** \*施红,医学博士,教授,从事中西医结合防治糖尿病的基础与临床研究, Tel:0591-22861151, E-mail:shihong3327@sina.com

金匱肾气丸,出自东汉医圣张仲景《金匱要略》,大量临床与动物研究表明该方具有降低血糖、糖化血红蛋白、促进胰岛素分泌、提高胰岛素敏感性、改善糖尿病肾病等功效<sup>[1-5]</sup>。胰岛素作为体内重要的调节糖脂代谢激素,其信号转导异常在糖尿病发生与发展过程中起重要作用,而金匱肾气丸调节胰岛素信号转导的相关临床与基础研究较少。故本实验以糖尿病模型大鼠骨骼肌的胰岛素受体(insulin receptor, InsR)表达变化为重点,探讨金匱肾气丸可能的降糖分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康的 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雄性,6 周龄,体质量为(220 ± 20)g,由中国科学院上海实验动物中心提供,动物许可证号为 SYXK(沪)2007-0005。

**1.2 药物** 金匱肾气丸(干地黄 24 g,山药 12 g,山茱萸 12 g,泽泻 9 g,茯苓 9 g,牡丹皮 9 g,桂枝 3 g,附子 3 g),上述中药饮片购于福建中医药大学国医堂,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室卢伟教授鉴定。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 1,2 g·mL<sup>-1</sup>,二甲双胍(天方制药股份公司,批号 20110320)。

**1.3 试剂及仪器** 链脉佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司, S0130), Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 1382739), RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit( Fermentas 公司,批号 00111863), SYBR PremixEx Taq™ II 实时定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号 BK3205], InsR-β 一抗(美国 Cell signaling 公司,批号 3020), Actin 一抗(美国 Sigma 公司,批号 A1978)。低温冰箱(美国 Thermofisher 公司),低温离心机(美国 Thermofisher 公司),7500 Fast Dx 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司),Mini Protean 垂直电泳装置(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 糖尿病模型大鼠制备** 随机选取 SD 大鼠 40 只,适应性喂养 1 周后,给予高脂高糖饲料(含蔗糖 15%,胆固醇 4%,胆酸钠 0.3%,猪油 10%,蛋黄粉 10%,基础膳食 60.7%)喂养 4 周,然后腹腔注射 0.25% STZ 1 次。STZ 剂量计算方法:体重 ≤ 200 g 的部分按 25 mg·kg<sup>-1</sup>计算, > 200 g 部分按 162.45 mg·m<sup>-2</sup>[表面积(m<sup>2</sup>) = 大鼠体型系数(0.09) × 体重(kg)<sup>2/3</sup>]计算,二者相加即为 1 次 STZ 的注射剂量。*ip* 后第 4 天检测空腹血糖(fasting blood

glucose, FBG),以 FBG ≥ 7.8 mmol·L<sup>-1</sup>为糖尿病模型。血糖未达标的大鼠,再给予相同剂量 STZ *ip* 1 次。另取正常组 10 只,给予普通饮食 4 周后,*ip* 0.1 mol·L<sup>-1</sup>枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(与模型组同体积量)。

**2.2 分组及给药** 筛选出的糖尿病模型大鼠按血糖水平随机为模型组、二甲双胍组、JKSQ 低、高剂量组。二甲双胍组 *ig* 给予二甲双胍 100 mg·kg<sup>-1</sup>, JKSQ 低、高剂量组 *ig* 给予金匱肾气丸水提液(10, 20 g·kg<sup>-1</sup>);正常组与模型组 *ig* 给予相同体积生理盐水。

治疗 4 周后,禁食不禁水 12 h,以 20% 乌拉坦麻醉,取股四头肌,用液氮速冻后,迅速转运至 -80 °C 冰箱保存备检。

**2.3 骨骼肌的己糖激酶与 6-磷酸果糖激酶-1 活性测定** 取约冻存的股四头肌约 1 g,用 PBS 洗涤 3 次后,加入液氮磨碎,加入 0.5 mL 蛋白提取液(含 50 mmol·L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.2), 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT),超声破碎,12 000 × g 4 °C 离心 15 min,上清液即总蛋白提取液。根据参考文献[6-7]方法,测定己糖激酶(hexokinase, HK)与 6-磷酸果糖激酶-1(6-phosphofructokinase-1, PFK)酶活性,结果以每克组织蛋白的酶活性表示。

**2.4 实时荧光定量 PCR 检测 InsR mRNA 表达** 采用 TRIzol 法提取大鼠骨骼肌细胞总 RNA,并琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 Olig(dT)<sub>18</sub> 为引物 42 °C 逆转录合成 cDNA。根据 GeneBank 提供的基因序列,以 Prime 5.0 软件设计 β-actin, InsR 基因引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,β-actin: 上游 5'-GCAGTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3', 下游 5'-TGTCACAAGAGAAGGCAGCCCTGG-3'(产物 101 bp); InsR: 上游 5'-GCCAGCGAGTGC TGCTCATGT-3', 下游 5'-GGGATGGCCTAGTGTCC TCAGCA-3'(产物 160 bp)。实时荧光定量 PCR 扩增反应体系 20 μL, 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, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 循环条件为 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法对 InsR mRNA 的表达水平进行定量分析,即处理组基因表达水平相对于正常组的变化倍数为 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 倍。

**2.5 蛋白印迹检测 InsR 蛋白水平的表达** 取约 0.5 g 组织,经 PBS 洗涤 3 次,加入液氮磨碎,加入

0.5 mL 全细胞裂解液,冰上裂解 15 min,超声破碎,于 4 ℃ 12 000 ×g 离心 15 min,上清为总蛋白提取液。取 50 μg 总蛋白提取液,以 8% 的 SDS-PAGE 分离胶电泳分离,全湿式电转膜法将目的蛋白转印至 PVDF 膜上。3% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入稀释的抗 InsR (1:1 000)、抗 β-actin (1:3 000) 的抗体,室温杂交 2 h。用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min。分别加入 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下温育 1 h,同样洗膜 3 次,然后采用 ECL 化学发光法,曝光 2 ~ 5 min 后,对胶片进行显影定影。用 BandScan 图像分析系统对区带进行吸光度 (IA) 扫描,InsR 蛋白质表达量 =  $IA_{InsR}/IA_{\beta-actin}$ 。

**2.6 统计学方法** 用 SPSS 15.0 进行统计分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠骨骼肌 HK,PFK 活性的变化** 与正常组比较,模型组经过 STZ 诱导,出现了 HK,PFK 活性下降 ( $P < 0.01$ );给药治疗 4 周后,与模型组相比较,二甲双胍组、JKSQ 低、高剂量组 HK,PFK 活性明显上升 ( $P < 0.05$ ),但组间无统计学差异。见表 1。

表 1 金匱肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌 HK,PFK 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	HK/U·g <sup>-1</sup>	PFK/U·g <sup>-1</sup>
正常	-	4.08 ± 0.23	15.79 ± 1.02
模型	-	2.27 ± 0.29 <sup>1)</sup>	8.35 ± 1.55 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.10	3.47 ± 0.11 <sup>2)</sup>	13.68 ± 1.73 <sup>2)</sup>
JKSQ	10	3.49 ± 0.23 <sup>2)</sup>	12.86 ± 1.01 <sup>2)</sup>
	20	3.96 ± 0.17 <sup>2)</sup>	14.59 ± 1.42 <sup>2)</sup>

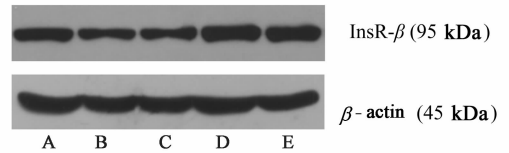
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$  (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 各组大鼠骨骼肌 InsR mRNA 表达比率的变化** 与正常组相比较,模型组经过 STZ 诱导,出现了 InsR mRNA 表达下降 ( $P < 0.01$ );治疗 4 周后,与模型组相比较,二甲双胍组、JKSQ 低、高剂量组 InsR mRNA 明显提高 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

**3.3 各组大鼠骨骼肌 InsR 蛋白质表达的变化** 与正常组比较,模型组 InsR 蛋白质表达下降 ( $P < 0.01$ );给药治疗 4 周后,与模型组相比较,二甲双胍组、JKSQ 低、高剂量组 InsR 的蛋白质表达明显提高 ( $P < 0.05$ )。见图 1 及表 3。

表 2 金匱肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌 InsR mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	β-actin/Ct	InsR/Ct	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
正常	-	15.08 ± 0.13	23.35 ± 0.25	1
模型	-	15.20 ± 0.19	24.59 ± 0.25	0.46 ± 0.22 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.1	15.18 ± 0.15	24.23 ± 0.23	0.58 ± 0.21 <sup>2)</sup>
JKSQ	10	15.29 ± 0.13	23.66 ± 0.27	0.93 ± 0.25 <sup>2)</sup>
	20	15.27 ± 0.16	23.10 ± 0.26	1.35 ± 0.27 <sup>2)</sup>



A. 正常组, B. 模型组, C. 二甲双胍 0.1 g·kg<sup>-1</sup> 组, D. JKSQ 10 g·kg<sup>-1</sup> 组, E. JKSQ 20 g·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 治疗后各组大鼠骨骼肌 InsR 蛋白质表达的变化

表 3 金匱肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌 InsR 蛋白质相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	InsR 蛋白质/β-actin
正常	-	0.72 ± 0.18
模型	-	0.32 ± 0.12 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.1	0.40 ± 0.20 <sup>2)</sup>
JKSQ	10	0.80 ± 0.29 <sup>2)</sup>
	20	0.85 ± 0.27 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

随着人们生活方式的改变,2 型糖尿病发病率逐年增加,我国糖尿病总患病人数已超 9 000 万人,如何有效防治糖尿病已成研究热点<sup>[8]</sup>。在我国传统医学中,糖尿病属“消渴”范畴。饮食不节、劳欲过度、禀赋不足、情志失调等各种因素,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。消渴病虽与五脏均有关,但以肺、脾、肾阳气虚为主,三者互相影响;后期主要责之于肾,肾中阴阳亏耗,是本病的根本所在<sup>[9]</sup>。金匱肾气丸作为千年古方,最早记载于《金匱要略》:“男子消渴,小便反多,以饮一斗,小便一斗,肾气丸主之”。该方由干地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、桂枝、附子八味药组成,方中地黄等滋阴补肾为主,基于阴阳可以互相滋生,通过滋阴补肾;同时桂枝、附子温阳补肾,阴阳双补,故能达到阳气振奋、肾气充实的功效,对临床阴阳两虚型糖尿病及糖

尿病肾病肾虚患者疗效较好<sup>[10]</sup>。

现代医学研究表明,2 型糖尿病的发生与胰岛素信号转导异常关系密切。InsR 是实现胰岛素信号跨膜转导的重要蛋白。胰岛素通过与靶细胞膜上 InsR 的细胞外  $\alpha$  亚基结合,引起细胞内  $\beta$  亚基酪氨酸残基自身磷酸化,进一步活化细胞内特定信号蛋白,从而发挥代谢调节、促进蛋白质合成等生理效应。研究表明,胰岛素受体数量、结构及分布的异常,是导致胰岛素信号转导障碍,发生胰岛素抵抗及糖代谢紊乱的重要原因之一<sup>[11]</sup>。本实验中观察到,高脂高糖联合 STZ 诱导损伤胰岛细胞导致大鼠血糖上升,骨骼肌细胞的 InsR mRNA 及蛋白质表达均下降,同时糖酵解途径的关键酶 HK 与 PFK 活性也明显降低。HK 与 PFK 正是胰岛素调节的靶酶之一,胰岛素通过跨膜信号转导,直接或间接的调节酶的化学修饰,能快速增加酶活性,促进骨骼肌氧化利用葡萄糖。笔者推测骨骼肌胰岛素受体的表达下调,介导了糖酵解途径的关键酶活性降低,葡萄糖氧化分解减少。通过金匮肾气丸治疗,能上调糖尿病模型大鼠的 InsR mRNA 及蛋白质水平的表达,并增加 HK 与 PFK 酶活性。

本研究揭示,金匮肾气丸防治糖尿病的药理机制可能与增加骨骼肌 InsR 表达,促进骨骼肌对葡萄糖的氧化利用有关。由于胰岛素信号转导涉及众多的信息转导蛋白,研究表明具备降糖作用的复方中药与单味中药参与调节胰岛素信号通路的信息分子,如增加 InsR,IRS-1/2,PI 3-K 等表达或磷酸化修饰等<sup>[12-16]</sup>,从而提高胰岛素的敏感性。因此针对不同的胰岛素信号通路蛋白分子的内在活性、转位过程或磷酸化水平等深入研究,有助于系统阐明金匮肾气丸调节胰岛素信号通路改善胰岛素抵抗的分子药理机制,对防治糖尿病有重要指导意义。

#### [参考文献]

[1] 吴红专. 金匮肾气丸治疗 2 型糖尿病的临床观察[J]. 中药药理与临床,2013,29(3):191.  
[2] 刘得华. 金匮肾气丸治疗阴阳两虚型 2 型糖尿病 62 例临床观察[J]. 新中医,2004,36(7):31.  
[3] 刘如玉,张捷平,余文珍,等. 金匮肾气丸对糖尿病模

型大鼠糖、脂代谢及 CRP 的影响[J]. 福建中医药大学学报,2013,23(4):32.

[4] 刘仙菊,胡方林. 金匮肾气丸对 2 型糖尿病模型大鼠脂肪代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 中医药导报,2011,17(11):22  
[5] 金智生,李甜,陈雪. 金匮肾气丸对 2 型糖尿病肾病大鼠 IGF-1 及 ET 的影响[J]. 上海中医药杂志,2011,45(11):76  
[6] 张捷平,秦崇涛,施虹. 石斛合剂对 HepG2 细胞葡萄糖激酶与丙酮酸脱氢酶的影响[J]. 海峡药学,2012,21(3):36.  
[7] 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.  
[8] Yang W Y, Lu J M, Weng J P, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N End J Med,2010,362(12):1090.  
[9] 陈燊,孙伟,孙海燕,等. 157 例糖尿病阳虚证型的临床分布研究[J]. 浙江中医杂志,2007,42(2):100.  
[10] 陈卫国. 金匮肾气丸的配伍特点及其临床指导意义[J]. 中医杂志,2009,50(4):378.  
[11] Hunter S J, Garrey W T. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system[J]. Am J Med, 1998,105(4):331.  
[12] 宋菊敏,舒适,刘小美,等. 复方黄连降糖片对 2 型糖尿病大鼠 IRS-1 基因表达的影响[J]. 上海中医药大学学报,2009(4):71.  
[13] 刘小美,宋菊敏,宋丽娜. 小檗碱对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞 InsR 与 IRS-1/2 蛋白表达的影响[J]. 上海中医药大学学报,2010(4):65.  
[14] 王芬,何华亮,江南,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):46.  
[15] 黄冬梅,陆付耳,黄光英. 补肾通脉方对胰岛素抵抗大鼠胰岛素信号转导的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(9):684.  
[16] 古文娟,刘頔,张孟仁,等. 人参皂苷 Rb1 对高糖培养海马神经元胰岛素信号转导途径的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(6):1064.

[责任编辑 聂淑琴]