

滋肾清肝降糖方对 2 型糖尿病大鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 及氧化应激的影响

薄海美, 田春雨, 薄建柱, 李建民, 魏勃, 赵济华, 崔建美, 李继安, 石峻, 韩淑英, 吴范武
(河北联合大学, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:研究滋肾清肝降糖方(ZQJC)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠糖代谢、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)表达及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和游离脂肪酸(FFA)的影响。方法:70 只雄性 SD 大鼠随机抽取 10 只大鼠为正常组,其余大鼠采用高脂饲料喂养联合 *ip* 30 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(STZ)的方法造 T2DM 模型,分为模型组、二甲双胍组(Met,0.14 g·kg⁻¹·d⁻¹,*ig*)、滋肾清肝降糖方低剂量组(0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹,*ig*)、滋肾清肝降糖方中剂量组(1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹,*ig*)及滋肾清肝降糖方高剂量组(3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,*ig*)。检测药物干预 2,4 周后各组大鼠空腹血糖(FBG)以及 4 周后各组大鼠血清中 SOD,MDA,FFA 的水平及肝细胞匀浆中 PTP1B 蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组的 FBG 均升高($P < 0.01$),PTP1B 在肝中的表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,ZQJC 各剂量组可显著降低大鼠血清 FBG,FFA 和 MDA 的含量($P < 0.01$, $P < 0.05$),升高血清 SOD 的活性($P < 0.05$),ZQJC 可降低 PTP1B 在肝中的表达。结论:滋肾清肝降糖方对 2 型糖尿病大鼠有调节糖代谢的作用,抑制 PTP1B 表达及氧化应激反应可能为其作用机制之一。

[关键词] 2 型糖尿病; 滋肾清肝降糖方; 糖代谢; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0111-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070111

Effect of Zishen Qinggan Jiangtang Compound on PTP1B and Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Rats

BO Hai-mei, TIAN Chun-yu, BO Jian-zhu, LI Jian-min, WEI Bo, ZHAO Ji-hua, CUI Jian-mei, LI Ji-an, SHI Jun, HAN Shu-ying, WU Fan-wu (Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Zishen Qinggan Jiangtang compound (ZQJC) on glucose, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) expression, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and free fatty acids (FFA) in type 2 diabetic mellitus (T2DM) rats. **Method:** Ten rats were randomly selected as normal group, type 2 diabetes model was induced with high sucrose-fat diet and STZ *ip* for 30 mg·kg⁻¹, rats were randomly divided into groups: model group, metformin (Met) group (0.14 g·kg⁻¹·d⁻¹, *ig*), ZQJCL group (0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹, *ig*), ZQJCM group (1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹, *ig*) and ZQJCH group (3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹, *ig*), 10 rats in each group. fasting blood glucose (FBG) was detected at 2nd week and 4th week, and the level of SOD, MDA, FFA in the rats' serum and PTP1B expression in liver at 4th week were measured after the treatment. **Result:** Compared with the normal group, the blood glucose levels of model group were increased ($P < 0.01$), PTP1B expressions in liver of model group were increased ($P < 0.01$). After treatment, compared with model group, ZQJC group could obviously decrease the levels of FBG, MDA and FFA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), improve SOD activity ($P < 0.05$) and inhibit the PTP1B expression in liver. **Conclusion:** ZQJC has the effect of regulating glucose metabolism of the T2DM rats, inhibition of oxidative stress and PTP1B expression in liver could be one of the mechanisms.

[Key words] type 2 diabetes; Zishen Qinggan Jiangtang compound; glucose metabolism; protein tyrosine phosphatase 1B

[收稿日期] 20140902(005)

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题(20130058);河北省中医药管理局科研计划项目(2013070);河北联合大学青年科学研究基金资助项目(Z201331)

[第一作者] 薄海美, 硕士, 讲师, 从事糖尿病防治研究, Tel:13722533361, E-mail:Bohaimei@sina.com

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 已知的主要病理基础,也是当今 T2DM 治疗中的一大难题, T2DM 防治研究已经成为世界各国医药学家研究的热点^[1]。近年来中药复方在防治 T2DM 的研究不断增加并且取得了良好的疗效。滋肾清肝降糖方由桑椹、桑叶、制何首乌、决明子组成,前期研究表明该方具有良好的调节糖、脂代谢的作用^[2],在此基础上,进一步研究其对肝脏组织蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 表达及血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和游离脂肪酸 (FFA) 水平的影响,以进一步探讨该复方的作用机制,从而为治疗糖尿病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重 (200 ± 10) g,购自北京华卓康生物科技有限公司,合格证号 SCXK(京)2013-0002。

1.2 试剂及药物 链脲佐菌素 (STZ,美国 Sigma 公司,批号 B56981),二甲双胍片 (Met,上海中美施宝有限公司,批号 1005023),MDA 试剂盒 (批号 20101227),SOD 试剂盒 (批号 20101228),均购自南京建成生物工程研究所,FFA 酶联免疫检测试剂盒 (美国 RD 公司,批号 20111002),滋肾清肝降糖方 (桑叶 15 g,制何首乌 15 g,桑椹 10 g,决明子 8 g),药材购自河北唐山市北京同仁堂药店。在河北联合大学中医学院中心实验室提取制备,用 10 倍量 80% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,提取液浓缩干燥,4 °C 冰箱保存。

1.3 仪器 7150 型全自动生化分析仪 (日本日立公司),Infinite M200 型酶标仪 (Austria Tecan 公司),AGM-2300 型血糖仪 (韩国糖博士公司)。

2 方法

2.1 T2DM 大鼠模型建立 雄性 SD 大鼠 70 只,适应性喂养 2 周,正常组 10 只给予普通饲料喂养;其余 60 只造模,给予高糖高脂饲料喂养 4 周后,ip STZ 30 mg·kg⁻¹ (STZ 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液中,pH 4.5),并继续给予高糖高脂饲料 2 周,禁食 12 h 后测定空腹血糖 (FBG),FBG ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 视为造模成功^[3,4],55 只造模成功。

2.2 给药方案 造模成功后次日给药,二甲双胍组 (Met,ig 0.14 g·kg⁻¹·d⁻¹),滋肾清肝降糖方低、中、高剂量组 (0.9,1.8,3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig),每组 10 只。药物用纯净水配成不同浓度的混悬液 ig。正常组和模型组 ig 以等量纯净水,连续给药 4 周。

2.3 指标检测

2.3.1 空腹血糖检测 各组大鼠于给药前、给药后 2,4 周,空腹 12 h 后采尾血,测定血糖。

2.3.2 分离血清及肝脏组织匀浆中 PTP1B 蛋白表达检测 给药 4 周后,用 8% 水合氯醛 ip 麻醉大鼠,腹主动脉取血 5 mL,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清,用于测定 SOD,MDA 及 FFA。分离大鼠肝脏,-80 °C 冷冻,组织匀浆放入 Western 及 IP 细胞裂解液裂解,BCA 法测定组织蛋白浓度。上样 60 μg 蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。针对特定的 PTP1B 第一抗体 GAPDH 进行膜的探测,4 °C 过夜,然后通过辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 2 h。ECL 染色,胶片曝光、显影、定影。胶片扫描后,使用 Image J 软件分析条带像素值,蛋白相对表达量 = 待测蛋白的像素值/GAPDH 的像素值。

2.3.3 SOD,MDA,FFA 检测 用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性,用硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量,用酶联免疫法检测血清中 FFA 含量。

2.4 数据分析 用 SPSS 16.0 分析软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 T2DM 大鼠 FBG 的影响 与正常组比较,成模大鼠 FBG 水平显著升高 ($P < 0.01$),说明糖尿病模型制备成功;与模型组比较,给药后 2,4 周,Met 组及滋肾清肝降糖方 3 个剂量组大鼠 FBG 水平显著减低 ($P < 0.01$),见表 1。

3.2 对 PTP1B 表达的影响 与正常组比较,模型组 PTP1B 在肝脏的表达增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,滋肾清肝降糖方组的 PTP1B 在肝中的表达降低,二甲双胍组有相似结果 ($P < 0.05$),见图 1,表 1。

3.3 对 T2DM 大鼠血清 FFA,SOD,MDA 的影响 与正常组比较,模型组血清中 SOD 的活性明显下降 ($P < 0.01$),而 FFA,MDA 的含量明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,Met 组、滋肾清肝降糖方 3 个剂量组的 SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),Met 组、滋肾清肝降糖方中、高剂量组 MDA 和 FFA 水平显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 2。

4 讨论

胰岛素抵抗 (IR) 和胰岛素缺乏是导致 T2DM 患者糖、脂代谢紊乱的主要原因,导致胰岛素抵抗的主

表 1 滋肾清肝降糖方对 T2DM 大鼠空腹血糖及肝脏 PTP1B 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Zishen Qinggan Jiangtang compound on FBG and PTP1B protein content in lever of T2DM mice ($\bar{x} \pm s$)

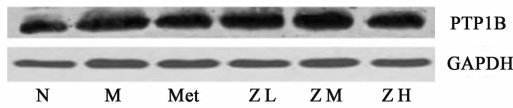
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	FBG/mmol·L ⁻¹			PTP1B 蛋白 /GAPDH
			0 d	14 d	28 d	
正常	-	10	6.5 ± 0.8	6.1 ± 0.5	6.0 ± 0.5	0.78 ± 0.05
模型	-	8	22.4 ± 5.6 ²⁾	22.3 ± 5.0 ²⁾	20.4 ± 5.4 ²⁾	1.75 ± 0.21 ²⁾
滋肾清肝降糖方	0.9	9	22.9 ± 5.1 ²⁾	15.2 ± 4.3 ⁴⁾	13.7 ± 3.6 ⁴⁾	1.19 ± 0.09 ³⁾
	1.8	10	22.8 ± 5.1 ²⁾	14.7 ± 3.3 ⁴⁾	10.1 ± 3.6 ⁴⁾	1.12 ± 0.08 ³⁾
	3.6	10	22.7 ± 5.2 ²⁾	10.7 ± 3.3 ⁴⁾	9.0 ± 2.0 ⁴⁾	1.08 ± 0.03 ³⁾
二甲双胍	0.14	10	23.8 ± 5.8 ²⁾	10.6 ± 3.5 ⁴⁾	8.8 ± 1.9 ⁴⁾	0.98 ± 0.06 ³⁾

注:与正常组比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2 同)。

表 2 滋肾清肝降糖方对 T2DM 大鼠 SOD,MDA 和 FFA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Zishen Qinggan Jiangtang compound on SOD,MDA,FFA of T2DM mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	FFA/μmol·L ⁻¹
正常	-	10	190.23 ± 12.78	10.28 ± 3.82	150.62 ± 15.57
模型	-	8	157.32 ± 14.82 ²⁾	18.94 ± 5.61 ²⁾	182.45 ± 21.91 ²⁾
滋肾清肝降糖方	0.9	9	178.49 ± 8.89 ³⁾	10.32 ± 2.22 ³⁾	172.16 ± 15.92 ³⁾
	1.8	10	184.86 ± 8.21 ³⁾	9.56 ± 2.95 ⁴⁾	163.12 ± 16.81 ³⁾
	3.6	10	182.31 ± 8.97 ³⁾	8.14 ± 2.71 ⁴⁾	151.35 ± 19.72 ⁴⁾
二甲双胍	0.14	10	183.39 ± 12.65 ³⁾	11.09 ± 4.32 ⁴⁾	150.87 ± 15.65 ⁴⁾



N. 正常组;M. 模型组;Met. 二甲双胍 140 mg·kg⁻¹组;Z L. 滋肾清肝降糖方 0.9 g·kg⁻¹组;Z M. 滋肾清肝降糖方 1.8 g·kg⁻¹组;Z H. 滋肾清肝降糖方 3.6 g·kg⁻¹组

图 1 各组大鼠肝组织 PTP1B 蛋白表达

Fig.1 PTP1B expression in liver of different group

要因素包括 FFA 的升高、氧化应激、炎症反应以及细胞内在机制异常等。FFA 是脂肪代谢的中间产物,是机体主要供给能量的来源,升高的 FFA 可以使胰岛素受体底物的丝氨酸残基磷酸化作用增强,影响了胰岛素介导的葡萄糖转运,导致糖代谢障碍,它抑制葡萄糖氧化,导致肝脏和骨骼肌 IR 和糖代谢障碍。SOD 是体内合成的氧自由基清除剂,其活性可反映机体抗氧化的能力。MDA 是生物膜中多价不饱和脂肪酸受自由基作用生成的脂质过氧化代谢产物,其含量反映机体脂质过氧化的速度和程度,代表自由基的活性^[5-6]。笔者通过实验发现滋肾清肝降糖方显著降低 T2DM 大鼠的 FBG,FFA 的水平和血清 MDA 的含量,提高血清 SOD 的活性,说明滋肾清肝降糖方可改善糖尿病大鼠糖代谢,抑制氧化应激反应。

PTP1B 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族中的主要成员,在胰岛素信号传导系统的平衡中起着重要作用。糖尿病大鼠及 2 型糖尿病、肥胖的病人肝脏、脂肪和骨骼肌等组织中 PTP1B 表达和活性升高,胰岛素抵

抗靶细胞的 PTP1B 活性变化与胰岛素抵抗密切相关^[7]。研究结果显示:滋肾清肝降糖方干预后肝脏组织 PTP1B 蛋白的表达降低,二甲双胍有类似效果,故本实验研究结果表明滋肾清肝降糖方改善胰岛素抵抗的分子机制可能与抑制 PTP1B 与氧化应激反应有关。

[参考文献]

[1] Yu Xu, Limin Wang, Jiang He, et al. Prevalence and control of diabetes in chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9):948-959.
 [2] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 滋肾清肝代平方对 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢作用的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(8):1745-1747.
 [3] 田春雨,薄海美,李继安. 桑椹多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):158-160.
 [4] 田春雨,刘志霞,王亚,等. 双益降糖方对 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):177-180.
 [5] 王姮,杨勇年. 糖尿病现代治疗学[M]. 北京:科学出版社, 2005:12-13.
 [6] 崔鹏,田春雨,张艳萍,等. 双益方对 2 型糖尿病大鼠 SOD,MDA,FFA 影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8):1840-1842.
 [7] 王森,邹大进. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 与 2 型糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(6):388-390.

[责任编辑 聂淑琴]