

# 积雪草醇提物对2型糖尿病ZDF大鼠肝脏胰岛素抵抗的影响

吴莉娟<sup>1</sup>, 孙文<sup>2</sup>, 吴丽丽<sup>2</sup>, 高健<sup>3</sup>, 穆晓红<sup>4</sup>, 秦灵灵<sup>5</sup>, 刘铜华<sup>5\*</sup>

- (1. 成都中医药大学临床医学院, 成都 610072; 2. 北京中医药大学中医养生所, 北京 100029;  
3. 对外经济贸易大学信息学院, 北京 100029; 4. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;  
5. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:探讨积雪草醇提物对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)ZDF(Zucker diabetic fatty)大鼠肝脏胰岛素抵抗的作用机制。方法:6只雄性ZDF(fa/+)大鼠设为正常组,成模的雄性ZDF(fa/fa)大鼠18只根据体重及随机血糖分层随机分为3组,模型组(生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup>),二甲双胍(二甲双胍片 0.18 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组,积雪草(积雪草醇提物 0.1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组。每2周监测大鼠体重,随机血糖(random blood glucose, RBG),空腹血糖(fasting blood glucose, FBG);给药6周后取材,检测大鼠空腹血糖及空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS),并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model of assessment for insulin resistance index, HOMA-IR)。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)法检测各组大鼠肝脏组织中胰岛素受体2(insulin receptor substrate 2, IRS2),3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1)及葡萄糖转运蛋白2(glucose transporter 2, GLUT2)mRNA的表达情况;免疫组化观察肝脏中PDK1, IRS2蛋白表达情况。结果:与模型组比较,积雪草组及二甲双胍组均可显著改善ZDF大鼠体重, RBG, FBG水平及HOMA-IR( $P < 0.01$ );积雪草组IRS2, PDK1及GLUT2 mRNA相对表达量及PDK1, IRS2蛋白表达水平显著增加( $P < 0.01$ )。结论:积雪草醇提物能有效改善2型糖尿病ZDF大鼠肝脏胰岛素抵抗,其作用机制可能与胰岛素信号传导通路中IRS2, PDK1的表达及葡萄糖转运中GLUT2的表达相关。

**[关键词]** 积雪草醇提物; 2型糖尿病; ZDF大鼠; 肝脏; 胰岛素抵抗

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0104-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100104

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0949.034.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-08 9:49

## Effect of Centella Asiatica Alcohol Extract on Hepatic Insulin Resistance of Zucker Fatty Diabetes Rats

WU Li-juan<sup>1</sup>, SUN Wen<sup>2</sup>, WU Li-li<sup>2</sup>, GAO Jian<sup>3</sup>, MU Xiao-hong<sup>4</sup>,  
QIN Ling-ling<sup>5</sup>, LIU Tong-hua<sup>5\*</sup>

- (1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;  
2. Health Cultivation Research Institution, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;  
3. Information Institute, University of International Business and Economics, Beijing 100029, China;  
4. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;  
5. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of centella asiatica alcohol extract on hepatic insulin resistance of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. **Method:** Six male (fa/+) ZDF rats were selected as control group, and 18 modeled male (fa/fa) ZDF rats were randomly divided into three groups, namely model group

**[收稿日期]** 20161026(008)

**[基金项目]** 国家国际科技合作专项(2012DFG31550)

**[第一作者]** 吴莉娟,在读博士,从事中医药防治内分泌疾病的研究, Tel:15801115036, E-mail:Drwu\_513@163.com

**[通讯作者]** \*刘铜华,博士,教授,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究, Tel:010-64286950, E-mail:thliu@vip.163.com

(normal saline  $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), metformin group ( $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and centella asiatica group ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) based on body weight and random blood glucose. Body weight, random blood glucose and fasting blood glucose were monitored every two weeks. Materials were collected six weeks later to measure the fasting blood glucose (FBG) and fasting serum insulin, and calculate insulin resistance index homeostasis model of assessment for insulin resistance index (HOMA-IR). Gene expressions of insulin receptor substrate 2 (IRS2), 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) and glucose transporter 2 (GLUT2) in the liver were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Protein expressions of PDK1 and IRS2 were observed by immuno-histochemical method. **Result:** The administration groups could significantly improve weight, random blood glucose, fasting blood glucose, fasting serum insulin and insulin resistance index of (fa/fa) ZDF rats ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, IRS2, PDK1 and GLUT2 mRNA expressions and PDK1 and IRS2 protein expressions of centella asiatica group increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Centella asiatica alcohol extract can effectively improve the hepatic insulin resistance of (fa/fa) ZDF rats. Its mechanism may be related to expressions of IRS2, PDK1 in insulin signaling pathway and glucose transporter GLUT2.

[Key words] centella asiatica alcohol extract; type 2 diabetes; ZDF rats; liver; insulin resistance

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 作为一种慢性代谢性疾病, 严重危害着人类健康。据 2016 年糖尿病流行病学研究显示, 全球的糖尿病患者率已从 1.08 亿上升到 4.22 亿, 其中我国有 1.03 亿, 占全球的 24.4%<sup>[1]</sup>。因此, 控制并延缓 T2DM 及其并发症的发生、发展迫在眉睫。目前发现 T2DM 的发病机制主要包括胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 及胰岛  $\beta$  细胞缺陷<sup>[2]</sup>, 其中, IR 是 T2DM 发生和发展的重要环节。肝脏是胰岛素作用及机体能量平衡的主要器官, 在 IR 中占有重要地位。研究显示, 肝 IR 主要是胰岛素抑制肝脏葡萄糖输出的能力下降, 葡萄糖的摄取减少, 致糖原合成的原料减少, 外周血糖升高<sup>[3-4]</sup>。GLUT2 是胰岛  $\beta$  细胞、肝细胞的主要葡萄糖载体, 在胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素及肝细胞的葡萄糖摄取及转运过程中扮演着重要角色<sup>[5]</sup>。中医药在 T2DM 防治过程中发挥着重要作用, 可多靶点、多途径调节脂代谢, 维持血糖稳态<sup>[6-7]</sup>。积雪草是我国传统中草药, 研究显示其提取物可改善大鼠胰岛素抵抗, 有效降低血糖等<sup>[8-9]</sup>。课题组前期研究立足于 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 途径, 发现积雪草醇提取物能有效改善高脂 + 链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 T2DM 大鼠脂代谢紊乱, 并改善肝脏功能<sup>[10]</sup>。本研究在前期研究基础上, 选用自发性 T2DM ZDF (Zucker diabetic fatty, ZDF) 大鼠为实验对象, 从胰岛素信号传递及葡萄糖转运角度出发, 观察积雪草醇提取物在肝脏中胰岛素受体 2 (insulin receptor substrate2, IRS2), 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1) 及葡萄糖转运蛋白 2

(glucose transporter 2, GLUT2) 表达, 进一步验证并探讨积雪草醇提取物改善肝胰岛素抵抗的疗效及作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠 18 只及 ZDF (fa/+ ) 大鼠 6 只, 购自北京维通利华实验技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001, 7 周龄, 体重 ( $200 \pm 20$ ) g。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心, 温度 ( $21 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 ( $60 \pm 10$ ) %, 12 ~ 12 h 光照-黑暗循环, 自由摄食、饮水。该实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理委员会 (编号 2015-025) 审查, 符合实验动物伦理委员会相关指导原则。

**1.2 试剂** Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596026); PCR 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, GLUT2 (151 bp): 上游 5'-TGACTGGAGCCCTCTTGATG-3', 下游 5'-CCCCTGAGTGTGGTTGGAG-3'; IRS2 (73 bp): 上游 5'-TAACGGCTGATGGAGTACA-3', 下游 5'-ATGGCCAGGACTTATGAAGG-3'; PDK1 (71 bp): 上游 5'-CGGCATAGAGCGGCAGGTT-3', 下游 5'-CCTTGCCAGCCTCATACCGA-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 146 bp): 上游 5'-GCATCCACTGGTGCTGCC-3', 下游 5'-TCATCATACTTGGCAGTTTC-3'; M-MLV 反转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号 4019); Random primer, dNTP, DNA Marker (日本 Takara 公司, 批号分别为 3801, 4019, D525S); SYBR mix (瑞士 Roche 公司, 批号 04913914001); PDK1 (PDK1) 兔抗大鼠抗体, IRS2

兔单克隆抗体,山羊血清[艾博抗(上海)有限公司,批号分别为 ab109253, ab134101];羊抗兔二抗(北京博奥森公司,批号 SP-0023);胰岛素放免试剂盒(北京中生北控科技股份有限公司, HY-10069);DAB 工作液(北京博奥森公司,批号 AE111701/C-0010);苏木素,伊红(北京索莱宝公司,批号分别为 G1140, G1100);血糖试纸(上海爱科来国际贸易有限公司,批号 B163D06)。积雪草醇提物由北京中医药大学药学院提供,积雪草 1 kg,每次用 75% 乙醇 30 L 加热回流提取 2 h,连续提取 3 次后合并提取液,减压浓缩得醇提浸膏 120 g,取适量浸膏用去离子水超声溶解。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字 H20023370, 0.5 g/片);动物饲料(PMI Labdiet 5008,上海介宏贸易有限公司)。

**1.3 仪器** BX53F 型光学显微镜及其成像系统(日本奥林巴斯公司),ZDP-A2080A 型恒温箱(上海智城公司),3K15/10797/9001678 型高速低温离心机(美国 Sigma 公司),QuantStudio™ 6 Flex 型 Real-time PCR 仪(美国 Life Technologies 公司),GT-1941 型血糖仪(上海爱科来国际贸易有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模及分组** 将大鼠适应性喂养 1 周后,取雄性 ZDF(fa/+ )大鼠 6 只作为正常组,给予普通饲料喂养;雄性 ZDF(fa/fa)大鼠给予 PMI Labdiet 5008 饲料诱导 4 周<sup>[11]</sup>,选不同日 2 次随机血糖平均  $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  者,为成模大鼠,共 18 只。按体重及随机血糖随机分为 3 组,模型组(生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),二甲双胍组(二甲双胍片  $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),积雪草组<sup>[10]</sup>(积雪草醇提物  $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),各 6 只。给药组均按体积  $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的体重标准灌胃给药,正常组和模型组则予相同剂量的生理盐水灌胃,连续 6 周。

**2.2 体重及血糖监测** 每 2 周监测大鼠体重。每 2 周上午采用血糖仪试纸法测 ZDF 大鼠尾尖静脉随机血糖(RBG);隔日禁食不禁水 10 h,采用血糖仪试纸法测空腹血糖(FBG)。

**2.3 取材** 第 6 周末,大鼠禁食不禁水 10 h,采用血糖仪试纸法检测 ZDF 大鼠尾尖静脉血 FBG 水平后,予 10% 水合氯醛( $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,腹主动脉取血,静置 3 h 后以  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 取血清,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存,放免法测空腹血清胰岛素(FINS)水平。将离体肝脏,部分置于 4% 多聚甲醛固定 24 h,制备石蜡切片;部分  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存以进行 PCR

反应。

**2.4 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算** 取材前所得 FBG 值及放免法所得血清 FINS 值,根据 HOMA-IR 计算公式:  $\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5$ ,计算 HOMA-IR。

**2.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测相关 mRNA 水平** 肝脏从液氮中取出后放入预冷的研钵中快速研磨,其后装入已加 Trizol 1 mL 的离心管中。抽取上清,加入三氯甲烷,剧烈震荡后,离心取上层水相,加入异丙醇,于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜。第 2 日,离心弃上清,得 RNA 沉淀。先后加入 75%,100% 乙醇,离心并弃上清,放置于通风橱中风干。将所得 RNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 处吸光度 A 和浓度,判断 RNA 纯度,并计算 RNA 浓度。将 RNA  $5 \text{ } \mu\text{L} + \text{Oligo}(\text{dT})_2 \text{ } \mu\text{L} + \text{ddH}_2\text{O} \text{ } 4.5 \text{ } \mu\text{L} + 5 \times \text{Buffer} \text{ } 5 \text{ } \mu\text{L} + \text{dNTP}(10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \text{ } 2 \text{ } \mu\text{L} + \text{Ribonuclease inhibitor} \text{ } 0.5 \text{ } \mu\text{L} + \text{M-MLVRT} \text{ } 1 \text{ } \mu\text{L}$  加入 0.5 mL 离心管中水浴,得到 cDNA。后将 cDNA  $2 \text{ } \mu\text{L} + \text{上游引物} \text{ } 0.5 \text{ } \mu\text{L} + \text{下游引物} \text{ } 0.5 \text{ } \mu\text{L} + \text{SYBR mix} \text{ } 10 \text{ } \mu\text{L} + \text{ddH}_2\text{O} \text{ } 7 \text{ } \mu\text{L}$  加入离心管中混匀,加样,离心后放入反应参数为  $94 \text{ }^\circ\text{C} \text{ } 10 \text{ min}; 94 \text{ }^\circ\text{C} \text{ } 15 \text{ s}; 60 \text{ }^\circ\text{C} \text{ } 1 \text{ min}; 45$  次循环,  $72 \text{ }^\circ\text{C} \text{ } 10 \text{ min}$  的 PCR 仪中,导出数据后,统计分析。

**2.6 免疫组化检测相关蛋白表达** 常规石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,滴加 0.01% Triton 后,微波加热以抗原修复,滴加正常山羊血清封闭,加入一抗 PDK1(1:500)及 IRS2(1:250)后,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜。经 PBS 冲洗后,加入羊抗兔二抗,DAB 显色,苏木素复染,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,中性树胶封片。PDK1 及 IRS2 表达率计算,每只大鼠取肝脏组织切片 5 张,每张切片在光镜镜头下随机观察 5 个肝小叶,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件,分析各组肝脏细胞质及细胞膜中的 PDK1,细胞质 IRS2 阳性表达,计算平均积分吸光度 IA。

**2.7 统计学方法** 所得数据均以 SPSS 17.0 统计软件处理,各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示;符合正态分布,方差齐时用单因素方差分析进行,方差不齐的数据,采用 Welch 检验;非正态分布,采用 Kruskal-Wallis 检验,以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠体重的影响** 与正常组比较,模型组大鼠体重显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍组、积雪草组第 0 及 2 周体重无显著差异;至第 4 周,二甲双胍组大鼠体重明显

下降 ( $P < 0.05$ ); 第 6 周, 二甲双胍组、积雪草组大鼠体重显著下降 ( $P < 0.01$ )。与二甲双胍组比较,

第 4, 6 周积雪草组大鼠体重明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常	-	250.33 ± 24.89	278.67 ± 21.18	293.50 ± 8.17	270.17 ± 9.11
模型	-	355.67 ± 18.58 <sup>1)</sup>	371.50 ± 20.70 <sup>1)</sup>	381.83 ± 8.86 <sup>1)</sup>	385.83 ± 8.47 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	351.50 ± 12.97	359.00 ± 14.71	349.17 ± 15.61 <sup>2)</sup>	326.67 ± 17.12 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	371.33 ± 19.41	373.17 ± 20.95	367.17 ± 15.64 <sup>4)</sup>	346.83 ± 19.17 <sup>3,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与二甲双胍组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~6 同)。

3.2 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 RBG 水平的影响  
与正常组比较, 模型组大鼠 RBG 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 二甲双胍组、积雪草组

大鼠 0~4 周 RBG 水平无显著差异; 至第 6 周 RBG 水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。积雪草组 0~4 周 RBG 水平与二甲双胍组比较无显著差异。见表 2。

表 2 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 RBG 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常	-	5.10 ± 0.60	5.22 ± 0.29	4.72 ± 0.55	4.23 ± 0.45
模型	-	29.38 ± 2.34 <sup>1)</sup>	29.40 ± 3.80 <sup>1)</sup>	25.88 ± 3.02 <sup>1)</sup>	27.38 ± 1.91 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	28.75 ± 4.58	25.72 ± 5.61	25.87 ± 2.81	23.98 ± 0.70 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	24.52 ± 4.81	27.02 ± 4.15	26.82 ± 1.97	22.78 ± 3.28 <sup>3)</sup>

3.3 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 FBG 水平的影响  
与正常组比较, 模型组大鼠 FBG 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 第 0, 2 周二甲双胍组、积雪草组大鼠 FBG 水平无显著差异; 第 4 周二甲双

胍组 FBG 均显著下降 ( $P < 0.01$ ); 第 6 周二甲双胍组、积雪草组 FBG 水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。与二甲双胍组比较, 积雪草组 2, 4 周 FBG 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 第 6 周 FBG 水平无显著差异。见表 3。

表 3 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 FBG 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常	-	3.82 ± 0.54	3.23 ± 0.35	3.40 ± 0.18	4.02 ± 0.38
模型	-	26.77 ± 7.41 <sup>1)</sup>	25.30 ± 9.34 <sup>1)</sup>	24.37 ± 6.28 <sup>1)</sup>	24.22 ± 5.68 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	22.72 ± 6.26 <sup>1)</sup>	20.47 ± 3.40 <sup>1)</sup>	13.25 ± 5.94 <sup>3)</sup>	10.02 ± 1.99 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	24.32 ± 4.78	26.47 ± 5.66 <sup>4)</sup>	20.40 ± 3.07 <sup>4)</sup>	13.40 ± 2.75 <sup>3)</sup>

3.4 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 FINS 水平及 HOMA-IR 的影响  
与正常组比较, 模型组大鼠 FINS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 二甲双胍组、积雪草组 FINS 水平有所升高, 但无统计学意义。与正常组比较, 模型组 HOMA-IR 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 二甲双胍组、积雪草组 HOMA-IR 显著降低 ( $P < 0.01$ )。与二甲双胍组比较, 积雪草组 FINS 及 HOMA-IR 无显著差异。见表 4。

表 4 积雪草醇提取物对 ZDF 大鼠 FINS 水平及 HOMA-IR 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	FINS/ $\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	HOMA-IR
正常	-	14.87 ± 1.44	2.67 ± 0.47
模型	-	19.30 ± 1.82 <sup>1)</sup>	21.08 ± 4.04 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	20.43 ± 2.28	9.21 ± 2.64 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	21.03 ± 1.78	11.39 ± 2.66 <sup>3)</sup>

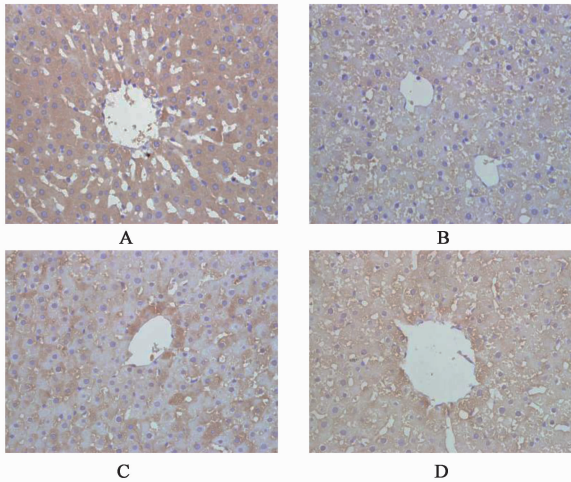
**3.5 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏 IRS2, PDK1 及 GLUT2 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠 IRS2, PDK1 及 GLUT2 mRNA 表达显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 积雪草组、二甲双胍组

大鼠 IRS2, PDK1 及 GLUT2 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与二甲双胍组比较, 积雪草组 IRS2, PDK1 及 GLUT2 mRNA 相对表达量无显著差异。见表 5。

表 5 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏 IRS2, PDK1 及 GLUT2 mRNA 相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IRS2/ GAPDH	PDK1/ GAPDH	GLUT2/ GAPDH
正常	-	1.090 ± 0.095	0.973 ± 0.182	0.959 ± 0.114
模型	-	0.419 ± 0.051 <sup>1)</sup>	0.490 ± 0.081 <sup>1)</sup>	0.559 ± 0.064 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	0.743 ± 0.053 <sup>3)</sup>	0.698 ± 0.115 <sup>2)</sup>	0.785 ± 0.046 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	0.640 ± 0.106 <sup>3)</sup>	0.767 ± 0.083 <sup>3)</sup>	0.760 ± 0.061 <sup>3)</sup>

**3.6 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏 PDK1 及 IRS2 蛋白表达的影响** 正常组大鼠肝脏边界清楚, 肝脏细胞分布正常, 细胞膜及细胞浆中可见大量 PDK1 及 IRS2 蛋白阳性表达; 模型组肝脏细胞内可见少量棕黄色 PDK1 及 IRS2 蛋白表达。与正常组比较, 模型组棕黄色阳性 PDK1 及 IRS2 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 给药组棕黄色阳性 PDK1 及 IRS2 蛋白表达显著增多 ( $P < 0.01$ )。与二甲双胍组比较, 积雪草组 PDK1, IRS2 蛋白表达明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1, 2, 表 6。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 积雪草组 (图 2 同)

图 1 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏细胞膜/质中 PDK1 蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of centella asiatica alcohol extract on PDK1 expression in cytomembrane or cytoplasm of hepatocyte of ZDF rats (IHC,  $\times 400$ )

#### 4 讨论

肝脏为机体能量代谢的重要器官, 维持机体糖代谢和脂代谢平衡, 其在 IR 发病过程中占有重要地位。正常情况下, 胰岛素通过促进肝糖摄取和抑制肝糖输出来恢复血糖的稳定。肝 IR 主要是胰岛素

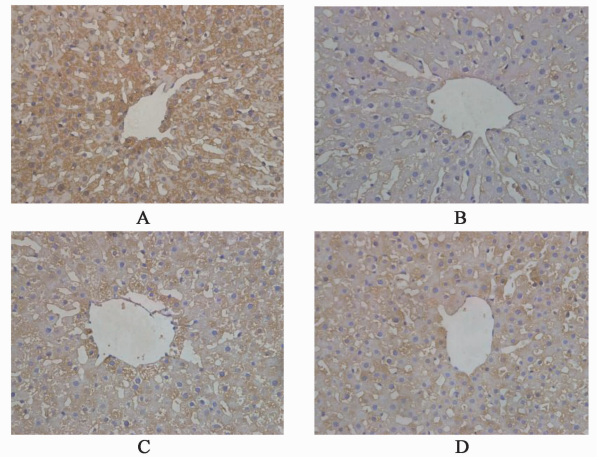


图 2 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏 IRS2 蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of centella asiatica alcohol extract on expression of IRS2 in cytoplasm of hepatocyte of hepatocyte of ZDF rats (IHC,  $\times 400$ )

表 6 积雪草醇提物对 ZDF 大鼠肝脏细胞膜/浆中 PDK1 及 IRS2 平均吸光度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Effect of centella asiatica alcohol extract on average optical density of PDK1 and IRS2 in cytomembrane or cytoplasm of hepatocyte of ZDF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	PDK1	IRS2
正常	-	0.491 ± 0.022	0.536 ± 0.054
模型	-	0.163 ± 0.017 <sup>1)</sup>	0.191 ± 0.011 <sup>1)</sup>
二甲双胍	0.18	0.301 ± 0.013 <sup>3)</sup>	0.379 ± 0.033 <sup>3)</sup>
积雪草	0.1	0.206 ± 0.015 <sup>3,5)</sup>	0.327 ± 0.029 <sup>3,4)</sup>

抑制肝脏葡萄糖输出的能力下降, 葡萄糖的摄取减少, 致糖原合成的原料减少, 外周血糖升高。长期的血糖升高, 致胰岛素分泌增多, 肝脏细胞内葡萄糖的转运增加, 促进糖原合成; 而当胰岛素敏感性下降, 胰岛细胞因长期过度代偿分泌胰岛素而衰竭, 血糖水平升高, 最终达到 T2DM 的诊断标准。胰岛素信号传导、葡萄糖转运在 IR 发生及发展过程中占有

重要作用。磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 途径是胰岛素在肝脏发挥生理效应的主要信号传导通路<sup>[12]</sup>, 胰岛素受体后信号转导障碍是 IR 的主要原因<sup>[13]</sup>。胰岛素受体底物 (IRS) 是胰岛素信号转导通路中受体后水平的重要信号蛋白, 主要在肝脏及胰岛细胞中表达。在胰岛素信号传导中, IRS2 能激活下游一系列酶, 将细胞外信号传递到细胞内, IRS2 缺陷所诱发的 IR 主要发生部位是肝脏, 促进肝葡萄糖输出, 抑制肝脏糖原合成<sup>[14-15]</sup>。PDK1 是蛋白激酶 B (PKB/C-Akt) 上游激酶, 通过与 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇作用, 激活相邻 Akt 分子, 以刺激糖吸收和储存<sup>[16-17]</sup>。GLUT2 是介导葡萄糖摄取的膜蛋白, 广泛存在于真核细胞膜上, 主要分布于肝、肾、肠和胰腺细胞, 具有很高的转运能力, 与葡萄糖代谢密切相关<sup>[18]</sup>。

在 PI3K 的信号传导过程中, 活化的 IRS 结合并激活 PI3K, 使磷酸肌醇依赖的蛋白激酶 1 (PDK1) 和/或蛋白激酶 C (PKC) 的某一亚型结合浆膜上 Akt 和 PDK1 的同域化, 促进 Akt308 位苏氨酸发生磷酸化, 加速 GLUT2 向细胞膜的转运, 调节肝细胞对葡萄糖的摄取。因此, 胰岛素信号传导中 IRS2, PDK1 的表达异常, 将影响下游胰岛素的传导, 致肝脏细胞中 GLUT2 的转运障碍, 肝糖输出增加, 而出现 IR。

本实验在积雪草醇提物前期研究基础上, 研究积雪草醇提物通过胰岛素信号传导、葡萄糖转运对 IR 的影响。积雪草, 又称落得打、崩大碗、半边钱, 最早记载于《神农本草经》, 为伞形科植物积雪草的干燥全草或带根全草。其性寒, 味苦、辛, 具有清热解毒、利湿消肿、活血化瘀等功效。临床上常用于湿热黄疸、跌打损伤、痈肿疮毒等。近年研究发现, 积雪草具有抗炎、抗抑郁、抗肿瘤、免疫调节及抗胃溃疡等药理作用<sup>[19-20]</sup>, 其提取物可促进皮肤愈合, 改善大鼠 IR, 有效降低血糖等<sup>[21]</sup>。国内外研究先后发现积雪草苷可以恢复神经功能, 抑制糖尿病周围神经痛<sup>[22-23]</sup>。其他动物实验发现积雪草苷可能通过减少海马内 A $\beta$  沉积以及增加 SYN 蛋白表达, 达到改善糖尿病模型小鼠的学习记忆功能<sup>[24]</sup>。

本实验采用自发性 T2DM 模型 ZDF 大鼠, 其由瘦素受体突变后筛选出的高胰岛素血症肥胖模型, 为目前 IR 常用动物模型<sup>[25]</sup>。饲料诱导 1 周后模型组大鼠即出现体重增加, FBG, FINS 及 HOMA-IR 升高。ZDF 大鼠瘦素突变, 致其食欲旺盛, 脂肪合成增加, 体重显著增加, 出现高血糖、高胰岛素血症及 IR<sup>[26-27]</sup>。实验中给予 ZDF 大鼠积雪草醇提物的剂

量为 0.1 g·kg<sup>-1</sup>, 主要是根据前期动物实验研究结果所选取的有效剂量<sup>[10]</sup>。灌喂 6 周后, ZDF 大鼠体重, FBG, RBG, FINS 水平及 HOMA-IR 等得以明显改善, IRS-2, PDK-1, GLUT2 mRNA 的相对表达量及 IRS-2, PDK-1 蛋白表达量显著增加。可能是因为积雪草醇提物上调胰岛素信号传导通路中的 IRS-2 及 PDK-1 mRNA, 增加胰岛素的信号传导, 并上调主要负责肝脏中葡萄糖转运蛋白 GLUT2 mRNA 的表达量, 以增加葡萄糖转运能力, 将葡萄糖从血液中转运至肝脏细胞内, 以改善 IR。

综上所述, 积雪草醇提物可显著改善 ZDF 大鼠体重, FBG, RBG, FINS 及 HOMA-IR 水平, 其作用机制可能是通过上调肝脏中 IRS2 的基因转录以传递胰岛素信号, 增加下游 PDK-1 的基因转录增加胰岛素的信号传导; 上调 GLUT2 表达, 以增加肝脏葡萄糖的转运, 达到改善肝 IR 的目的。

#### [参考文献]

- [1] ZHOU B, LU Y, Hajifathalian K, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387 (10027): 1513-1530.
- [2] Muoio D M, Newgard C B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9 (9): 193-205.
- [3] 黄冬梅, 陆付耳. 胰岛素信号转导障碍与胰岛素抵抗的形成 [J]. *生理科学进展*, 2003, 34 (3): 212-216.
- [4] 贾伟平. 胰岛素抵抗在 2 型糖尿病发病机制中的作用 [J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8 (3): 233-236.
- [5] Bell G I, Kayano T, Buse J B, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters [J]. *Diabetes Care*, 1990, 13 (3): 198-208.
- [6] 马燕, 袁月新, 张俊梅, 等. 黄连相关中药复方治疗糖尿病及其并发症的研究概况 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (12): 272-275.
- [7] 张青, 李琰, 陈磊. 黄连素对 2 型糖尿病及其并发症的治疗作用及相关机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (9): 1660-1665.
- [8] 张蕾磊, 王海生, 姚庆强, 等. 积雪草化学成分研究 [J]. *中草药*, 2005, 36 (12): 1761-1763.
- [9] 项佳眉, 肖伟, 许利嘉, 等. 积雪草的研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18 (2): 233-237.
- [10] 吴欣莉, 李林忆, 刘铜华, 等. 积雪草醇提物治疗 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的实验研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30 (5): 1525-1530.
- [11] Etgen G J, Oldham B A. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state

- [J]. *Metabolism*, 2000, 49(5):684-688.
- [12] 王军,姜宏卫. 磷脂酰肌醇3激酶与2型糖尿病[J]. *国外医学:内分泌学分册*, 2001, 21(6):294-296.
- [13] 舒适,宋菊敏. 胰岛素受体底物-1/-2与胰岛素信号传导[J]. *医学综述*, 2008, 14(5):723-726.
- [14] Rhodes C J, White M F. Molecular insights into insulin action and secretion [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(S3):3-13. doi:10.1046/j.1365-2362.32.s3.2.x.
- [15] Niessen M. On the role of IRS2 in the regulation of functional beta-cell mass [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2006, 112(2):65-73.
- [16] 迟素敏. 内分泌生理学[M]. 北京:第四军医大学出版社, 2006:11-13.
- [17] 谢平,宁惠萍. 胰岛素信号蛋白与胰岛素抵抗[J]. *国外医学病理、生理科学与临床分册*, 2001, 21(1):48-50.
- [18] Stolarczyk E, Le Gall M, Even P, et al. Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice [J]. *PLoS One*, 2007, 2(12):e1288.
- [19] 戴卫波,梅全喜,孔祥廉. 积雪草的化学成分与药理作用研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(6):1566-1568.
- [20] CHENG C L, Koo M W L. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats [J]. *Life Sci*, 2000, 67(21):2647-2653.
- [21] 郑承红,孔彩霞,彭聪,等. 积雪草对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗影响的研究[J]. *内科急危重症杂志*, 2011, 17(2):88-90.
- [22] Soumy anath A, ZHONG Y P, Gold S A, et al. *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation *in vitro* [J]. *J Pharmacol*, 2005, 57(9):1221-1229.
- [23] 金艳,高晓洁. 积雪草苷对糖尿病周围神经痛的作用及其机制[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5):39-41.
- [24] 应娜,尹竹君,于海洋,等. 积雪草苷对糖尿病模型小鼠认知功能的干预作用[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2014, 24(3):203-206.
- [25] 陈华. 医学实验动物学[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2013:257.
- [26] Unger R H. How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Trends Endocrin Met*, 1997, 8(7):276-282.
- [27] Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 57(2/4):91-97.

[责任编辑 张丰丰]