

昆仑雪菊提取物对糖尿病大鼠胰岛素抵抗 IRS-1/ PI3K/GLUT4 信号通路的影响

舒畅¹, 范强¹, 杨丽霞^{2*}, 姜良恩¹, 张邦能³, 康万荣¹, 张延英¹, 万生芳¹
(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050;
3. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**观察昆仑雪菊提取物对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠血糖、胰岛素分泌水平及胰岛素受体底物-1/磷脂酰肌醇(-3)激酶/葡萄糖转运蛋白4(IRS-1/PI3K/GLUT4)信号传导通路的影响。**方法:**将35只雄性STZ诱导的糖尿病Wistar大鼠随机分为5组,模型组、昆仑雪菊提取物低、中、高剂量组、吡咯列酮组,每组7只;另选7只SPF级雄性Wistar大鼠为正常组。正常组和模型组灌服生理盐水,昆仑雪菊低、中、高剂量组,分别按100,200,400 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量灌胃,吡咯列酮组灌服吡咯列酮10 mg·kg⁻¹·d⁻¹。连续4周。4周后,心包外抽血,离心取血清;取胰腺组织。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠胰岛素(INS)分泌水平;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测骨骼肌IRS-1,PI3K, GLUT4的蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测骨骼肌GLUT4的mRNA表达。**结果:**灌胃4周后,经检测发现昆仑雪菊提取物对降低糖尿病大鼠体重作用不明显,但对空腹血糖、餐后2h血糖具有降低作用,并在一定程度上能够促进胰岛素分泌,促进调节因子IRS-1,PI3K, GLUT4的表达,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**昆仑雪菊提取物可降低2型糖尿病大鼠血糖,促进胰岛素分泌,提高大鼠骨骼肌IRS-1,PI3K, GLUT4的表达,改善胰岛素抵抗。

[关键词] 昆仑雪菊提取物; 糖尿病大鼠; 血糖; 胰岛素信号通路; 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)11-0122-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110122

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1013.048.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:13

Effect of *Coriopsis* Extract on IRS-1/PI3K/GLUT4 Signaling Pathway in Diabetic Rats with Insulin Resistance

SHU Chang¹, FAN Qiang¹, YANG Li-xia^{2*}, JIANG Liang-en¹, ZHANG Bang-neng³,
KANG Wan-rong¹, ZHANG Yan-ying¹, WAN Sheng-fang¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Province Academy of TCM, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu Province Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of *Coriopsis* extract on the levels of blood sugar, insulin secretion, and insulin receptor substrate-1/phosphatidyl inositol kinase (3) /glucose transporter type 4 (IRS-1/PI3K/GLUT4) pathway of signal transduction in streptozocin (STZ) -induced diabetic rats. **Method:** Total 35 male STZ-induced diabetic Wistar rats were randomly divided into five groups: model group, *Coriopsis* extract low, medium and high dose groups, and positive control group ($n = 7$ in each group); another 7 SPF male Wistar rats were used as normal controls. Normal saline was given in normal group and model group; the rats in *Coriopsis*

[收稿日期] 20160920(036)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(1308RJYA106);兰州市科技局项目(2014-1-20)

[第一作者] 舒畅, 硕士, 副教授, 从事中医药防治糖尿病的研究, Tel:13919820784, E-mail: 1091002328@qq.com

[通讯作者] * 杨丽霞, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治糖尿病的研究, Tel:13038770310, E-mail: yanglixia-415@163.com

extract low, medium and high dose groups received 100, 200, 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ extract respectively by intragastric administration; the rats in positive control group were administered with pioglitazone 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹. After four weeks of treatment, pericardial blood was taken and serum was taken by centrifugation; in addition, pancreatic tissues were taken. ELISA assay was used to test the insulin (INS) level in rats; Western blot assay was used to test the protein expression levels of IRS-1, PI3K and GLUT4 in skeletal muscle; GLUT4 mRNA expression level was tested by Real-time PCR. **Result:** After 4 weeks of treatment, the effect of *Coriopsis* extract on reducing the body weight of diabetic rats was not obvious, but it could reduce the fasting blood glucose, postprandial 2 h blood glucose obviously, promote insulin secretion to a certain extent, and promote the expression levels of regulatory factors IRS-1, PI3K and GLUT4, with significant difference as compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Coriopsis* extract can reduce blood sugar in type 2 diabetic rats, promotes insulin secretion, improve IRS-1, PI3K, GLUT4 expression levels in skeletal muscle of rats, and improve insulin resistance.

[**Key words**] *Coriopsis* extract; diabetic rats; blood glucose; insulin signaling pathway; insulin resistance

2 型糖尿病 (T2DM) 是以高血糖和脂代谢异常为特征的慢性代谢性疾病,其患病率持续上升,已成为严重威胁人类健康的疾病之一^[1]。T2DM 的主要发病机制即胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 与胰岛 β 细胞功能缺陷导致的胰岛素分泌相对不足。其中 IR 是指机体组织的靶器官或靶细胞对内外源性胰岛素的敏感性及其反应性降低,导致机体组织对葡萄糖摄取和利用的能力下降,因而产生低于正常量的生物学效应。IR 会使糖代谢、脂代谢发生紊乱,同时通过调节胰岛素信号转导途径使胰岛素的合成和分泌增加,产生高胰岛素血症^[2]。IR 的形成机制复杂,是近年来热点研究问题之一,但至今其分子机制尚不完全清楚。近年来许多同仁在胰岛素信号传导通路方面做了大量研究工作,越来越多研究表明,胰岛素信号传导通路与 IR 相关^[3]。

目前临床上治疗糖尿病的主要办法是用化学合成药物或胰岛素来刺激胰岛素分泌或增加糖的消耗来控制机体血糖的平衡^[4]。近些年许多中草药及其活性成分降低血糖的作用被发现,使得中药防治糖尿病成为国内外的研究热点^[5]。昆仑雪菊生长在海拔高 3 000 m 左右的昆仑山区,长期以来,被当地人当作药材使用,用花泡茶饮,可治疗燥热烦渴、高血压、心慌、胃肠不适、食欲不振、痢疾及疮疗肿毒等疾病^[6]。研究表明,昆仑雪菊主要含有黄酮类、多糖类、皂苷类等成分,此外还含有氨基酸、挥发油、绿原酸等成分。昆仑雪菊具有降血脂^[7]、降血压^[7]、抗癌^[8]、抗病毒^[9]、抗凝血^[10]等作用,近年来国外学者发现雪菊花具有明显的抗炎消肿作用^[11],以及通过抗氧化应激反应来保护胰岛 β 细胞的作用^[12]。因此,昆仑雪菊具有广阔的研究价值和市场前景。本实验通过观察昆仑雪菊提取物对 T2DM 大

鼠胰岛素信号传导通路的影响,探讨该药对 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重 (200 ± 20) g,购于甘肃中医药大学,合格证号 SCXK (甘) 2004-0006。饲养于甘肃中医药大学屏障级动物实验室,每天自由饮水、摄食。本研究获得甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准,实验均符合中国伦理委员会相关动物研究指导原则。

1.2 药品与试剂 昆仑雪菊,采自青海,由青海优润堂商贸有限责任公司提供,由甘肃中医药大学药学院李成义教授鉴定为菊科一年生草本植物两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* 的干燥花蕾;由上海友思生物技术有限公司提取分离。昆仑雪菊提取物的制备:昆仑雪菊 5 kg,用 20 倍体积的水 (约 100 L) 煮沸提取 2 次。合并提取液,水提液用纱布过滤,浓缩至约 50 L。浓缩水提液加于事先用水平衡的大孔吸附树脂上,加载完毕后,先用水洗脱约 20 L,再用 20% 乙醇溶液 50 L 洗脱,收集馏分;再用 40% 乙醇 50 L 洗脱,并收集馏分。20% 乙醇洗脱液浓缩至干,得到提取物约 300 g;40% 乙醇浓缩至干得到提取物约 200 g。经检测,提取物的主要成分是水溶性的黄酮。盐酸吡格列酮片 (北京太洋药业有限公司产品,批号 130605),链脲佐菌素 (STZ,美国 Sigma 公司,批号 046K1206),胰岛素试剂盒 (Cusabio 公司,批号 CSB-E05070r),罗氏活力型血糖试纸 (Accu-Chek Active,德国 Roche Diagnostics GmbH 公司)。抗体胰岛素受体底物-1 (IRS-1) (1:500 稀释) (英国 Abcam 公司,批号 ab52167),磷脂酰肌醇 (3) 激酶 (PI3K) p85 (1:1 000 稀释) (美国 Cell Signaling 公司,批号 4292)。葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4, 1 mg·L⁻¹ 稀释)

(英国 Abcam 公司,批号 ab25893)。Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 47303),M-MLV 反转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 K4205BA),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增试剂盒(北京中原领先科技有限公司,批号 11732927),焦碳酸二乙酯(DEPC,美国 Sigma 公司,批号 D5758),PCR 引物(上海生工生物工程有限公司,批号 A2-5)。引物序列见表 1。

表 1 GLUT4 的 mRNA 表达引物序列

Table 1 GLUT4 mRNA expression primer sequence

引物	序列	长度/bp
GLUT4	上游 5'-GTTGGTCTCGGTGCTCTTAG-3'	151
	下游 5'-GGCCACGATGACACATAAC-3'	
β -actin	上游 5'-GCAGTTGGTTGGAGCAA-3'	114
	下游 5'-ATGCCCTGGATACTTGA-3'	

1.3 仪器 罗氏活力型血糖仪及血糖试纸(德国 Roche Diagnostics GmbH 公司);BXS01-BIO-RAD680 型酶标仪,PowerPac 型稳压稳流电泳仪,164-5050 型垂直电泳槽,170-3940 型半干转电转印仪(美国 Bio-Rad 公司);NBIX 型计算机图像分析仪(南京宁博仪器分析有限公司);UV-2800 型紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司);ABI 7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备与给药 大鼠适应性饲养 1 周后,除正常组 7 只外,其余大鼠均给予高糖高脂饲料,8 周末行尾静脉注射 STZ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),1 周后取尾静脉血测定血糖,随机血糖稳定 $> 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诊断为 2 型糖尿病,视为造模成功^[12]。选取造模成功的大鼠 35 只,随机分为 5 组,模型组、昆仑雪菊提取物低、中、高剂量组、吡咯列酮组,每组 7 只。共 6 组。正常组和模型组灌服生理盐水,昆仑雪菊提取物低、中、高剂量组,分别按 $100, 200, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量灌胃,吡咯列酮组灌服吡咯列酮 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。所有药品用生理盐水配成所需的质量分数,1 次/d,连续 4 周。4 周后,禁食 8 h,麻醉,一次性采血管心脏采血,处死后取胰腺及骨骼肌。血液静置 2 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存;胰腺组织 4% 甲醛固定,常温保存;骨骼肌置干冰盒, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.2 酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清胰岛素水平 根据试剂盒说明书进行,检测前先对所有样本进行低速离心,在反应孔中加标准品或待测标本,每

孔剂量为 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 。在空白孔中加入稀释液,剂量为 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 。然后在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 电热培养箱进行孵育,孵育后对检测板进行洗涤,最后加酶标抗体进行酶联免疫反应。反应终止后,将检测板在酶标仪上进行检测,以空白孔调零,检测条件为 450 nm ,测定各孔吸光度 A 。

2.3 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测骨骼肌 IRS-1,PI3K,CLUT4 的蛋白表达 组织加入液氮研磨后加细胞裂解液冰上放 20 min。然后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,进行 BCA 法蛋白含量测定。剩余蛋白样品加等体积 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液,沸水中煮 5 min。配制 10% SDS-PAGE 分离胶,注入垂直制胶架,用水封闭,静置 1 h。加 5% 浓缩胶,插入加样梳,静置。待完全凝结后撤去下方的海绵边条,将制备好的凝胶玻璃板垂直固定于电泳仪上,加入电泳缓冲液。小心拔去加样梳,以电泳缓冲液冲洗加样孔数次。分别取总蛋白样品 $40 \text{ } \mu\text{g}$,按 1:4 体积比加入 $5 \times$ 样品缓冲液,沸水中煮 5 min 使蛋白变性。将处理好的样品按照预定的顺序加入浓缩胶上样孔内,每张胶上加入 Marker $10 \text{ } \mu\text{L}$ 作为参考。然后进行电泳、脱脂奶粉封闭,室温振荡 60 min。抗原抗体反应及显影:封闭结束后,用 TBS-T 漂洗液洗膜 3 次,每次 10 min,将膜移入杂交袋中,加入用适当漂洗液稀释的抗体,封口, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;再用大量 TBS-T 漂洗液洗膜 3 次,每次 10 min,然后将 PVDF 膜移入另一新的杂交袋,加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡 60 min,大量 TBS-T 漂洗液洗膜 3 次,每次 10 min,将 PVDF 膜置 ECL 混合液中于室温下振荡温育 5 min,每平方厘米膜片至少使用 ECL 混合液 0.125 mL 以覆盖全膜片,用平头镊钳住膜片,垂直置于吸水纸以吸去过量试剂,置膜片于两层保鲜膜之间,小心赶尽气泡。将膜片吸附蛋白面朝上,显影,定影。扫描。用 IPP 软件进行灰度分析。

2.4 Real-time PCR 检测骨骼肌 GLUT4 的 mRNA 表达 总 RNA 提取,将组织从液氮中取出,放入预冷的研钵中加入液氮进行快速研磨,然后将粉末装入预冷的 EP 管中,每管加入 Trizol 1 mL ,用枪吹打数次,室温放置 5 min。以 1:5 Trizol 的比例加入三氯甲烷,盖紧离心管,用手剧烈摇荡离心管 15 s,待充分乳化溶液呈乳白状,室温放置 2~3 min。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 离心 15 min。取上层水相(含 RNA),加入异丙醇,室温放置 20 min。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 离心 10 min。弃上清,按 1:1 Trizol 液加入 75% 乙醇(DEPC 水配制)。轻轻上下翻转, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $7\ 500 \times g$ 离心 5 min。小心弃上清,室

温干燥 3 min。将 RNA 溶于 DEPC 水 30 ~ 50 μL 中。核酸紫外分光光度计测定经稀释的 RNA 提取物的 A 和浓度,判断 RNA 纯度,计算 RNA 浓度。RNA 样品长期保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。然后进行 RNA 体外反转录与 Real-time PCR。Real-time PCR 程序设置, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 45 循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析结果。

2.5 统计学分析 统计处理用 SPSS 19.0 统计软件, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间用单因素方差分析,

$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 昆路雪菊提取物对大鼠血清空腹血糖 (FPG), 餐后 2 h 血糖 (2 h PBG), 胰岛素 (INS) 水平的影响, 与正常组比较, 模型组大鼠 FPG, 2 h PBG 显著升高, INS 分泌显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 吡咯列酮、昆仑雪菊提取物各剂量组的 FPG, 2 h PBG 呈下降趋势, INS 分泌则呈增加趋势, 其中昆仑雪菊提取物中、高剂量组更为明显 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 昆仑雪菊提取物对大鼠血清 FPG, P2 hPG, INS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of *Coriopsis* extract on serum FPG, P2 hPG, INS levels in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	FPG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 h PBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	INS/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	4.30 \pm 0.20	6.05 \pm 0.43	90.03 \pm 18.72
模型	-	26.20 \pm 3.80 ¹⁾	30.90 \pm 1.60 ¹⁾	19.41 \pm 19.36 ¹⁾
吡咯列酮	10	25.45 \pm 7.33	23.95 \pm 3.19 ²⁾	43.44 \pm 57.10 ²⁾
昆仑雪菊提取物	100	18.34 \pm 7.11 ²⁾	27.74 \pm 3.82	39.30 \pm 35.70 ²⁾
	200	16.73 \pm 4.97 ²⁾	25.93 \pm 4.24	35.37 \pm 42.38 ²⁾
	400	16.91 \pm 7.33 ²⁾	23.65 \pm 6.77 ²⁾	42.53 \pm 49.67 ²⁾

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

3.2 昆路雪菊提取物对大鼠骨骼肌 IRS-1, PI3K p85, CLUT4 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠骨骼肌 IRS-1, PI3K p85, CLUT4 的蛋白表达

显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各药物组 IRS-1, PI3K p85, CLUT4 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 1。

表 3 昆仑雪菊提取物对大鼠骨骼肌 IRS-1, PI3K p85, CLUT4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of *Coriopsis* extract on protein expression levels of IRS-1, PI3K p85, CLUT4 in skeletal muscle of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IRS-1/GAPDH	PI3K p85/GAPDH	CLUT4/GAPDH
正常	-	1 628.79 \pm 449.30	3 507.98 \pm 654.73	68.79 \pm 44.30
模型	-	426.14 \pm 226.45 ¹⁾	1 599.07 \pm 514.01 ¹⁾	23.14 \pm 12.41 ¹⁾
吡咯列酮	10	1 080.43 \pm 156.33 ²⁾	2 439.87 \pm 1 088.58 ²⁾	48.43 \pm 22.46 ²⁾
昆仑雪菊提取物	100	712.38 \pm 205.10 ²⁾	2 287.53 \pm 691.13 ²⁾	21.24 \pm 16.26 ²⁾
	200	718.13 \pm 370.80 ²⁾	2 514.33 \pm 480.56 ²⁾	26.33 \pm 19.08 ²⁾
	400	733.02 \pm 199.17 ²⁾	2 610.42 \pm 1015.86 ²⁾	34.02 \pm 25.87 ²⁾

3.3 昆路雪菊提取物对大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠骨骼肌 GLUT4 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 昆仑雪菊提取物低、中、高剂量组及吡咯列酮组 GLUT4 的 mRNA 表达显著上升 ($P < 0.05$)。见表 4。

核固缩。各用药组均有不同程度的改善。见图 2。

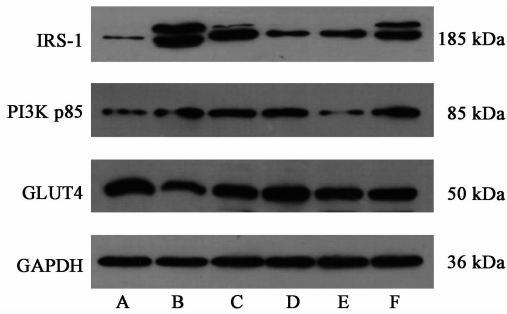
3.4 昆路雪菊提取物对大鼠胰腺组织形态的影响

大鼠胰腺组织经 HE 染色, 光镜下观察显示: 正常组大鼠胰岛边界清楚, 结构完整, 外部形态丰满, 胰岛细胞分布均匀, 各细胞核呈椭圆形, 胞浆丰富, 胰岛数量及岛内细胞数均较多。模型组大鼠胰岛数量减少, 体积变小, 边界不清, 胰岛细胞胞浆减少, 细胞

表 4 昆仑雪菊提取物对各组大鼠骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of *Coriopsis* extract on GLUT4 mRNA expression in skeletal muscle of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	GLUT4
正常	-	1.35 \pm 1.18
模型	-	0.10 \pm 0.04 ¹⁾
吡咯列酮	10	0.67 \pm 0.14 ²⁾
昆仑雪菊提取物	100	0.18 \pm 0.06 ²⁾
	200	0.23 \pm 0.08 ²⁾
	400	0.36 \pm 0.11 ²⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 吡格列酮组; D. 昆仑雪菊提取物低剂量组; E. 昆仑雪菊提取物中剂量组; F. 昆仑雪菊提取物高剂量组(图 2 同)

图 1 昆仑雪菊提取物对大鼠骨骼肌 IRS-1, PI3K p85, GLUT4 的蛋白表达

Fig. 1 Effect of *Coriopsis* extract on protein expression levels of IRS-1, PI3K p85, GLUT4 in skeletal muscle of rats

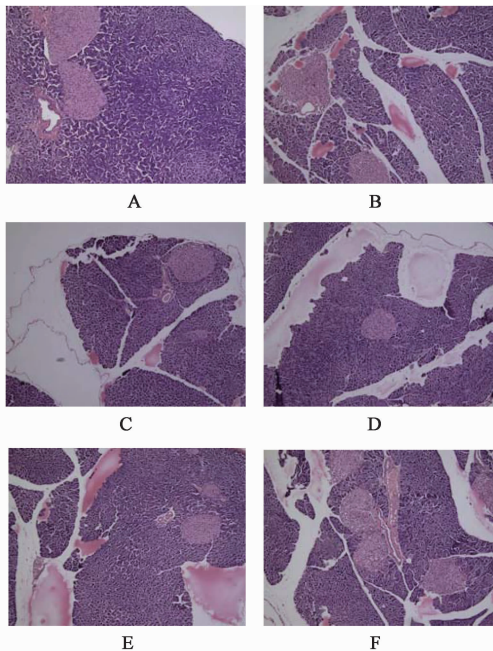


图 2 昆仑雪菊提取物对大鼠胰腺组织形态的影响(HE, ×100)

Fig. 2 Effect of *Coriopsis* extract on morphology of rats pancreatic tissues(HE, ×100)

4 讨论

胰岛素通过血液循环到达靶器官后,通过与靶器官胞膜表面的胰岛素受体结合,再通过受体后信号传导,调节代谢和基因的表达而实现其生理功能^[3]。IRS-1/PI3-K 信号传导通路是胰岛素对代谢功能调节主要途径之一。在此信号传导通路中,当胰岛素与靶器官胞膜表面的胰岛素受体(InsR)结合时,InsR 即发生磷酸化,其磷酸激酶使 IRS-1 磷酸化。磷酸化后的 IRS-1 能够激活 PI3K,使信号以激酶链式反应下传。IRS-1 通过激活 PI3K 激酶导致磷酸肌醇依赖的蛋白激酶(PKD-1)的激活,PKD-1 可使蛋白激酶 B(PKB)磷酸化,活化的 PKD-1 或磷

酸化的 PKB 可加速 GLUT4 从细胞内转移至细胞膜,调节肌肉组织和脂肪组织对葡萄糖的摄取利用^[13-14]。IRS-1, PI3K, PKD-1, PKB 均是 IRS-1/PI3K 信号传导通路中的调节因子,其中任何一个因子或环节出现障碍或异常均可导致 IR,出现糖尿病,特别是 T2DM^[15]。已有研究发现,胰岛素抵抗和糖尿病状态时肌肉和脂肪组织中 InsR 和 IRS-1 在胰岛素刺激后的络氨酸磷酸酸化水平降低,胰岛素信号传导减弱^[16-17]。

目前制备糖尿病大鼠模型的方法主要有自发性动物模型^[18]、转基因动物模型^[19]和实验性动物模型^[20]。本实验采用的是目前国内外使用最普遍的实验性动物模型。国内外研究一致表明,通过高脂饮食诱导大鼠胰岛素抵抗后,再注射低剂量 STZ 损伤胰岛功能,引起血糖升高制备的 T2DM 大鼠模型,可模拟 T2DM 的发病过程^[21-23]。STZ 可造成大鼠组织蛋白被极度破坏^[24-25],表现出明显的多食、多饮、多尿和体重减轻的症状。本实验 STZ 诱导的糖尿病大鼠经过药物治疗后,与模型组比较,昆仑雪菊提取物各剂量组的 FPG, 2 hPBG 明显下降,INS 分泌增加,其中高剂量组尤为显著,说明该药物具有降低糖尿病大鼠 FPG, 2 hPBG, 促进 INS 分泌,改善胰岛素抵抗作用;各药物组 IRS-1, PI3K, GLUT4 的蛋白表达具有不同程度上升。昆仑雪菊提取物低、中、高剂量组及吡格列酮组 GLUT4 的 mRNA 表达上升。

本研究结果显示:昆仑雪菊提取物调节血糖平衡,促进胰岛素分泌的机制可能是通过调节胰岛素受体信号传导通路 IRS-1/PI3K 途径磷酸化水平与蛋白表达,提高 GLUT4 mRNA 的表达和跨膜转运,促进了大鼠肌肉组织和脂肪组织对葡萄糖的吸收和利用来实现的。

[参考文献]

- [1] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Globalestimates ofdiabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103 (2):137-149.
- [2] 吴南楠,李强. 代谢综合征的发病机制研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(1):95-98.
- [3] 张满英,景影,李蕊,等. 胰岛素抵抗性糖尿病发病机制的分析[J]. 中国实验诊断学杂志, 2011, 15(9):1610-1611.
- [4] 陈浩,龚利,邵盛,等. 糖尿病运动疗法研究进展[J]. 中医学报, 2015, 30(2):186-188.
- [5] 张培利,郭慧娟,张国丽. 中药的糖尿病防治作用浅析[J]. 航空航天医学杂志, 2014, 25(11):

- 1584-1585.
- [6] 买买提·艾买提,木合布力·阿布力孜,孟磊. 新疆昆仑雪菊水溶性总黄酮的含量测定[J]. 海峡药学, 2010,22(10):56-58.
- [7] 梁淑红,庞市宾,刘晓燕,等. 金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):234-235.
- [8] 帕尔哈提·买买提依明,令狐晨,朱青梅,等. 雪菊对肝癌和肺癌细胞体外抗肿瘤作用研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(24):46-48.
- [9] 茹克娅·胡加阿不都拉,斯依提尼沙汗·吾满尔. 雪菊花药用功能及临床应用体会[J]. 中国民族民间医药,2011,19(2):41-42.
- [10] 明婷,庞市宾,哈木拉提,等. 金鸡菊提取物对微循环及抗凝血作用的实验研究[J]. 农垦医学,2012,34(1):17-19.
- [11] Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, et al. Constituents of compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-*o*-fatty acid esters from edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects[J]. J Agric Food Chem,2001(49):3187-3197.
- [12] 杨架林,李果,刘优萍,等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐菌素建立人类普通2型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报,2003,11(3):138-141.
- [13] Pagliassotti M J, Kang J, Thresher J S, et al. Elevated basal PI3-kinase activity and reduce insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance[J]. Am J Physiol:Endocrinol Metab,2002,282(1):170-176.
- [14] Karlsson M, Thorn H, Parpal S, et al. Insulin reduces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes[J]. FASEB J,2002,16(2):249-251.
- [15] Faster L, LI D, Randhawa V, et al. Insulin accelerates inter-endosomal GLUT4 traffic via phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B[J]. J Biol Chem,2001,276(47):1412-1416.
- [16] Hotamisligli G S, Budavari A, Murray D, et al. Reduce tyrosine kinaseactivity of the insulin receptor in obesity diabetes[J]. J Clin Invest,1994,94(4):1543-1549.
- [17] Hotamisligli G S, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance[J]. Science,1996,271(5249):665-668.
- [18] Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous dia-betic rats by repetition of selective breeding[J]. Tohoku J Exp Med,1976,119(1):85-90.
- [19] Srinivasan K, Ramarao P. Anamal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. Indian J Med Res,2007,125(3):451-472.
- [20] Al-Khalifa A, Mathew T C, Al-Zaid N S, et al. Low carbohy-drate ketogenic diet prevents the induction of diabetes using strep-tozotocin in rats[J]. Exp Toxicol Pathol,2011,63(7/8):663-669.
- [21] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. Diabetes Care,2003,26(S1):5-20.
- [22] Dias T, Mota-Filipe H, LIU B, et al. Recovery of oral glucose tolerance by Wistar rats after treatment with *Coreopsis tinctoria* infusion[J]. Phytother Res,2009,24(5):699-705.
- [23] Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafataki K, et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus [J]. In Vivo,2009,23(2):245-248.
- [24] Kamalakkannan N, Prince P S. Antihypergaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats[J]. BCPT,2006,98(1):97-103.
- [25] Saha S K, Haque M E, Islam D, et al. Comparative study between the effect of *Momordica charantia* (wild and hybrid variety) on hypoglycemic and hypolipidemic activity of alloxan induced type 2 diabetic longevans rats [J]. J Diabetes Mell,2012,2(1):131-137.

[责任编辑 邹晓翠]