

葛根对2型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白 GRP78, ATF6表达的影响

张路煜¹, 刘玉晖^{1*}, 游宇², 刘荣华¹, 刘浩坤³, 王海贝¹, 黄海华^{2*}

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006;
3. 赣南医学院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:观察葛根对2型糖尿病(T2DM)大鼠的疗效及其相关作用机制。方法:90只SD大鼠分为正常组、模型组、二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组,每组15只。对非正常组大鼠高脂高糖饲料喂养4周后采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)40 mg·kg⁻¹制造T2DM模型。葛根高、中、低剂量组分别灌胃葛根浸膏2.1, 1.4, 0.7 g·kg⁻¹,二甲双胍组灌胃盐酸二甲双胍0.2 g·kg⁻¹,正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水,1次/d。灌胃8周后,测量大鼠空腹血糖(FBG),糖化血清蛋白(GSP),胰岛素(FINS),甘油三脂(TG),胆固醇(TC)含量,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);免疫组化观察胰腺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胰腺组织中葡萄糖调节蛋白78(GRP78),活化转录因子6(ATF6)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组的FBG, GSP, TG, TC, FINS, TNF- α 含量明显增高($P<0.05$), HOMA-IR指数明显上升($P<0.05$),胰腺组织中GRP78, ATF6蛋白表达明显增高($P<0.05$);与模型组比较,二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组FBG, GSP, TG, TC, FINS, TNF- α 含量均明显降低($P<0.05$), HOMA-IR指数明显降低($P<0.05$),胰腺组织中GRP78, ATF6蛋白表达明显降低($P<0.05$)。结论:葛根可以显著改善T2DM大鼠胰岛素抵抗,抑制胰腺组织中炎症因子TNF- α 的表达,减少胰腺组织中内质网应激相关蛋白GRP78, ATF6的表达。

[关键词] 葛根; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 炎症因子; 内质网应激

[中图分类号] R2-0; R289; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0082-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202036

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200813.1412.006.html>

[网络出版日期] 2020-8-13 16:32

Effect of Puerariae Lobatae Radix on Expression of Endoplasmic Reticulum Stress Related Proteins GRP78 and ATF6 in T2DM Rats

ZHANG Lu-yu¹, LIU Yu-hui^{1*}, YOU Yu², LIU Rong-hua¹, LIU Hao-kun³,
WANG Hai-bei¹, HUANG Hai-hua^{2*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
3. Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Puerariae Lobatae Radix on type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats and related mechanism. **Method:** Ninety SD rats were divided into normal group, model group, metformin group, Puerariae Lobatae Radix high dose group, Puerariae Lobatae Radix medium dose group and Puerariae Lobatae Radix low dose group, 15 rats in each group. The rats in abnormal group were fed with high-fat and high sugar diet for 4 weeks, and then T2DM model was established by intraperitoneal injection of

[收稿日期] 20200428(002)

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”专项(2017YFC1702902)

[第一作者] 张路煜, 硕士, 从事中药药理机制研究, E-mail: 494428470@qq.com

[通信作者] *刘玉晖, 博士, 副教授, 从事中药药理心血管方向研究, E-mail: liuyuhui77@126.com;

*黄海华, 副主任医师, 从事内分泌调节方向研究, E-mail: 13879120712@126.com

40 mg·kg⁻¹ streptozotocin (STZ). Puerariae Lobatae Radix high-dose group was intragastrically administered with 2.1 g·kg⁻¹ of Puerariae Lobatae Radix extract powder, Puerariae Lobatae Radix medium-dose group was intragastrically administered with 1.4 g·kg⁻¹ of Puerariae Lobatae Radix extract powder, Puerariae Lobatae Radix low-dose group was intragastrically administered with 0.7 g·kg⁻¹ of Puerariae Lobatae Radix extract powder, 0.2 g·kg⁻¹ of metformin hydrochloride in metformin group, distilled water once a day in normal group and model group. After 8 weeks, fasting blood glucose (FBG), glycosylated serum protein (GSP), insulin (FINS), triglyceride (TG), cholesterol (TC) were measured, and insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was observed by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the protein expression of glucose regulatory protein 78 (GRP78), activated transcription factor 6 (ATF6) in pancreatic tissue. **Result:** Compared with normal group, the contents of FBG, GSP, TG, TC, FINS, TNF- α in model group were significantly increased ($P<0.05$), the HOMA-IR was significantly increased ($P<0.05$), the protein expressions of GRP78 and ATF6 in pancreatic tissue were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, the contents of FBG, GSP, TG, TC, FINS and TNF- α in the metformin group and Puerariae Lobatae Radix high, medium and low dose groups were significantly decreased ($P<0.05$), HOMA-IR decreased significantly ($P<0.05$), and the expression of GRP78 and ATF6 protein in pancreatic tissue decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Puerariae Lobatae Radix can significantly improve insulin resistance in T2DM rats, inhibit the expression of inflammatory factor TNF- α in pancreatic tissue, reduce the protein expression of GRP78 and ATF6 in pancreatic tissue.

[Key words] Puerariae Lobatae Radix; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; inflammatory factors; endoplasmic reticulum stress

近几年的研究发现,2型糖尿病(T2DM)的发病率逐年上升^[1]。现在降糖的西药成为了治疗糖尿病的主流,然而降糖的西药副作用很多,如低血糖、水肿、乳酸酸中毒、胃肠道不适等。相反,中药在控制病情,降低血糖与抑制糖尿病并发症方面疗效确切,并且副作用相对较小^[2]。葛根是豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根,具有解表退热,生津止渴,升阳透疹的功效^[3]。葛根的药用价值较高,受到医药学界的广泛关注,关于葛根的药理药效研究发展迅速,为疾病的防治提供有效的理论依据^[4]。

内质网应激(ERS)是细胞的一种适应性及保护性调节,目的是通过增加内质网的折叠能力、处理损伤的蛋白质来减少错误折叠蛋白的蓄积而恢复内质网(ER)稳态。ER上有3个感受未折叠蛋白堆积的感受器蛋白:蛋白激酶样内质网激酶(PERK),内质网跨膜激酶1(IRE1)和活化转录因子6(ATF6)^[5]。内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白78(GRP78)作为多功能调节剂,当内质网处于稳态时,GRP78能结合IRE1,PERK,ATF6感受器蛋白的内质网内端,维持信号转导因子的非活化状态^[6-7]。不同的刺激类型和程度可单独或共同触发ERS,ERS 3条通路可单独发挥作用,也可协同工作,相互调节、相互制约。

研究表明,炎症是T2DM的发病机制之一^[8],炎症因子中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可以直接干扰胰岛素受体的信号传导系统,使机体的胰岛素受体敏感性下降,促使整个机体的外周组织胰岛素抵抗(IR),血糖升高。实验证明,ERS是肥胖,IR及T2DM的关键枢纽。当机体短时间承受高糖负荷时,ERS在胰岛细胞中起着有利的调节作用,通过非折叠蛋白反应(UPR)促进蛋白有效折叠,因而此时对胰岛细胞具有保护作用;但在慢性高糖应激时,ERS却可通过一定的机制导致胰岛 β 细胞功能紊乱,甚至触发细胞凋亡机制使胰岛 β 细胞进入凋亡程序^[9]。ERS时,组织细胞的胰岛素信号受到阻滞,从而机体组织胰岛素受体敏感性改变,也可引发胰岛素抵抗。所以T2DM时间持续过长或强度过强的ERS信号通路都可以引起胰岛 β 细胞的功能障碍和胰岛素抵抗。二甲双胍药物可以降低血糖,改善IR,降低TNF- α 表达水平^[10-11]。金领微等^[12]证实二甲双胍可以通过调控ERS信号通路,下调GRP78,ATF6的蛋白表达改善大鼠机体ERS的状态。葛根是否能通过调控ERS信号通路,下调GRP78,ATF6蛋白表达从而改善T2DM大鼠机体ERS的状态尚未阐明。

因此,本实验研究采用高脂高糖饲料喂养联合

腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制造T2DM模型,观察葛根对T2DM大鼠空腹血糖(FBG),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),TNF- α 及GRP78,ATF6蛋白表达的作用。阐释葛根对T2DM的作用机制,为临床更好的运用中药提供科学的依据。

1 材料

1.1 动物 90只SPF级雄性SD大鼠,体质量160~180g,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2016-0002,饲养于江西中医药大学实验动物科技中心SPF级屏障环境内,温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度(55 \pm 3) $^{\circ}$ C,12h灯光暗亮交替,动物自由进食饮水。本实验获得江西中医药大学动物伦理委员会批准,批准号JZLLSC2019-0301。

1.2 药物和试剂 本实验药品由江西中医药大学药学院提供,经药学院专家刘荣华教授鉴定为正品葛根。取葛根200kg投入于6m³多功能提取罐中,加入15倍量自来水,加热至100 $^{\circ}$ C沸腾,真空泵循环抽取提取液3次,趁热抽滤,离心分离机过滤,双效浓缩器加热浓缩,真空带式干燥器干燥后粉碎混匀,得葛根浸膏药粉70.3kg,葛根生药制备葛根浸膏药粉的得率为35.15%,浸膏药粉备用;盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号AAZ0862);STZ(北京索莱宝科技有限公司,批号1228M036);甘油三脂(TG),总胆固醇(TC),糖化血清蛋白(GSP)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20190907,20190906,20190903);中性甲醛固定液(北京雷根生物技术有限公司,批号0321A18);石蜡,甲醛,二甲苯,无水乙醇(上海国药集团,批号分别为69018961,10010018,10023418,10092680);ECL显色盒(美国Abbkine公司,批号ATSOC2401);DAB浓缩型试剂盒(上海长岛生物技术有限公司,批号为FL-6001);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号9009001100);脱脂奶粉(美国BD公司,批号6307951); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号4970S-15);GRP78抗体,ATF6抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR3261371-1,GR3248070-5);TNF- α 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-10802R);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号A0208)。

1.3 仪器 Accu-Chek Active型罗氏活力血糖仪(罗氏血糖健康医护公司);TKD-TSB型组织脱水机(湖北康强医疗器械有限公司);TB-718D型石蜡包

埋机(湖北泰维科技实业有限公司);RM2235型石蜡切片机(德国徕卡公司);CX41型正置显微镜(日本奥林巴斯有限公司);D5100型数码相机(日本尼康公司);041BR120387型电泳仪、水平和垂直电泳槽、转移槽,721BR09151型伯乐凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);702型-80 $^{\circ}$ C冰箱,2K15型台式高速冷冻离心机(美国Thermo公司);H1650-W型普通台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Elx800型酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 造模、分组和给药 90只SD大鼠随机分为6组,分别为正常组,模型组,二甲双胍组,葛根高剂量组,葛根中剂量组,葛根低剂量组,每组15只。正常组喂养基础饲料4周,其余各组给与高脂高糖饲料喂养4周。4周后,禁食不禁水12h,非正常组一次性腹腔注射STZ 40mg \cdot kg⁻¹,正常组注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。3d后,尾尖穿刺法测各组大鼠血糖,以FBG>7mmol \cdot L⁻¹为T2DM大鼠成模标准^[13]。根据历代葛根用量分析,葛根临床用量多为10~60g^[14]。取60kg的人每天临床用量葛根60,40,20g分别作为给药的高、中、低剂量,根据人与大鼠体表面积公式和1.2项下所述生药制备浸膏药粉的得率,计算可得葛根高、中、低剂量组灌胃浸膏药粉剂量分别为2.1,1.4,0.7g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,正常组大鼠灌胃蒸馏水,二甲双胍组灌胃二甲双胍原药0.2g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,严格按照大鼠体质量灌胃给药,每天灌胃1次,连续灌胃8周,自由进食饮水。

2.2 标本采集 灌胃第8周后,禁食不禁水12h,随后测量FBG。麻醉大鼠后腹主动脉取血,血液静置2h,随后3500r \cdot min⁻¹离心10min(离心半径10cm),取血清,随后取大鼠胰腺进行后续实验。

2.3 微量酶标法检测血清中糖化GSP含量 严格按照试剂盒说明书操作,在96孔板中设空白孔、标准孔、标准空白孔、测定孔;分别加入双蒸水10 μ L,DMF标准液、牛血清白蛋白、样本血清;加入NBT显色剂200 μ L于各孔中,37 $^{\circ}$ C水浴15min;加入稳定剂10 μ L于各孔中,摇匀,在酶标仪530nm波长处检测,计算血清中GSP的含量。

2.4 GPO-PAP酶法检测血清中TG,TC含量 严格按照试剂盒说明书操作,在96孔板中设空白孔、标准孔、样本孔;分别加入蒸馏水2.5 μ L,标准品、样本于各孔中;每孔加入工作液250 μ L,混匀;37 $^{\circ}$ C孵育10min,酶标仪波长510nm处测定各孔吸光度A,计算各样本TG及TC含量。

2.5 碘-125 (¹²⁵I)胰岛素放射免疫法检测血清中 FINS 含量 严格按照试剂盒说明书操作,取圆底聚苯乙烯试管若干,记号笔编号,然后用微量加样器分别将各组大鼠血清及标准品各 100 μL 加入聚苯乙烯试管,各管分别加入抗体与 ¹²⁵I-Ins 各 100 μL,充分混匀,37 °C 温育 2 h;各管中加入驴抗豚免疫分离剂 500 μL 混匀后于 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,摒弃上清液,检测沉淀的 CPM 值,计算各组大鼠 FINS 水平。胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = (FBG×FINS)/22.5。

2.6 免疫组化检测胰腺组织 TNF-α 的表达 将制作完成的石蜡切片脱蜡至于水中,放入柠檬酸抗原修复缓冲液中进行抗原修复,室温条件下放入 3% 双氧水溶液中避光孵育 20 min,切片上滴加 3% BSA 溶液覆盖组织,室温封闭 35 min。滴加一定比例配好的 TNF-α 一抗稀释液 (1:250) 于切片,4 °C 孵育过夜。滴加二抗 (1:50),室温孵育 50 min, DAB 显色,苏木素复染 3 min,脱水封片。结果采用 Image-pro Plus 对积分吸光度 IA 进行测定。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测胰腺组织中 GRP78, ATF6 蛋白的表达 提取胰腺组织蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定各组样品的蛋白浓度,制

备各组相同浓度的蛋白样品。按照配方制备 10% 的分离胶和浓缩胶,对蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,剪取 NC 膜,250 mA 转膜 90 min,5% 脱脂牛奶中摇床封闭 2 h,放入用 5% 脱脂牛奶提前配制好的 GRP78 一抗稀释液 (1:3 000),ATF6 一抗稀释液 (1:1 000),β-actin 一抗稀释液 (1:1 000) 中,放置于冰箱中摇床 4 °C 过夜。放入一抗相对应种属的二抗稀释液 (1:2 500) 中摇床室温孵育 2 h, TBST 溶液充分洗膜后利用化学发光发 (ECL) 法显影。采用 Image J 软件对各组蛋白进行灰度值分析。

2.8 统计学方法 各组数据处理采用 SPSS 21.0 完成,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性分析后,采用单因素方差分析处理数据,并用 LSD 进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 T2DM 大鼠体质量与 FBG 的影响 治疗前,与正常组比较,模型组及各给药组大鼠体质量均明显降低 ($P < 0.05$),血糖均明显升高 ($P < 0.05$);治疗 8 周后,与模型组比较,二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组体质量均明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),空腹血糖明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 葛根对 2 型糖尿病大鼠体质量、空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Effect of Puerariae Lobatae Radix on body weight and fasting blood glucose in rats with type 2 diabetes mellitus ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	治疗前		治疗后	
		体质量/g	FBG/mmol·L ⁻¹	体质量/g	FBG/mmol·L ⁻¹
正常	-	472.7±23.3	5.2±0.4	637.9±42.7	5.1±0.5
模型	-	440.1±27.5 ¹⁾	16.5±3.3 ¹⁾	324.6±40.9 ¹⁾	17.2±2.4 ¹⁾
二甲双胍	0.2	442.3±22.5 ¹⁾	16.5±3.2 ¹⁾	366.5±56.1 ²⁾	11.9±3.9 ²⁾
葛根	2.1	435.2±32.7 ¹⁾	14.9±3.7 ¹⁾	355.9±63.4 ²⁾	11.3±3.5 ²⁾
	1.4	443.6±28.2 ¹⁾	15.1±4.0 ¹⁾	382.1±79.3 ²⁾	8.9±3.8 ²⁾
	0.7	440.6±28.9 ¹⁾	14.6±3.9 ¹⁾	350.6±40.9 ²⁾	10.4±4.6 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~5 同)。

3.2 对 T2DM 大鼠 GSP 的影响 与正常组比较,模型组 GSP 含量明显高于正常组 ($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组 GSP 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 T2DM 大鼠血清中 TC, TG 含量的影响 与正常组比较,模型组中 TC, TG 含量均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组 TC, TG 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对 T2DM 大鼠血清 FINS 含量及 HOMA-IR 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 FINS 含量明显升

表 2 葛根对 2 型糖尿病大鼠 GSP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effect of Puerariae Lobatae Radix on glycosylated serum protein in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSP/mmol·L ⁻¹
正常	-	1.317 2±0.033 9
模型	-	2.108 6±0.328 3 ¹⁾
二甲双胍	0.2	1.419 3±0.117 8 ²⁾
葛根	2.1	1.442 2±0.118 6 ²⁾
	1.4	1.420 0±0.021 4 ²⁾
	0.7	1.627 6±0.042 8 ²⁾

表 3 葛根对 2 型糖尿病大鼠 TC, TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 3 Effect of Puerariae Lobatae Radix on TC, TG in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG
正常	-	3.18±0.09	1.48±0.07
模型	-	3.68±0.13 ¹⁾	1.72±0.07 ¹⁾
二甲双胍	0.2	3.50±0.15 ²⁾	1.49±0.08 ²⁾
葛根	2.1	2.95±0.11 ²⁾	1.64±0.04 ²⁾
	1.4	3.20±0.13 ²⁾	1.50±0.02 ²⁾
	0.7	2.97±0.12 ²⁾	1.51±0.07 ²⁾

高 ($P<0.05$), HOMA-IR 指数明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组 FINS 含量明显降低 ($P<0.05$), HOMA-IR 指数明显降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 葛根对 2 型糖尿病大鼠 FINS 含量和 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Effect of Puerariae Lobatae Radix on FINS, HOMA-IR in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

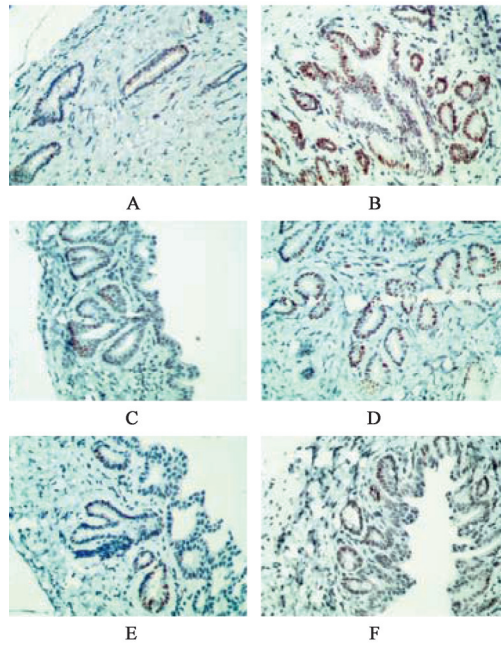
组别	剂量/g·kg ⁻¹	FINS/mU·L ⁻¹	HOMA-IR
正常	-	17.37±1.27	3.99±0.59
模型	-	40.20±2.70 ¹⁾	30.02±2.99 ¹⁾
二甲双胍	0.2	22.31±1.31 ²⁾	9.85±2.25 ²⁾
葛根	2.1	30.04±3.65 ²⁾	14.33±5.51 ²⁾
	1.4	31.70±4.68 ²⁾	10.95±2.92 ²⁾
	0.7	36.15±6.11 ²⁾	16.99±3.29 ²⁾

3.5 对 T2DM 大鼠胰腺中 TNF- α 表达水平的影响
阳性细胞的阳性表达细胞核呈棕褐色; 阴性细胞表达无棕褐色且在图片上细胞核呈蓝色。与正常组比较, 模型组胰腺腺泡细胞分泌的 TNF- α 表达明显增加; 与模型组比较, 二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组胰腺腺泡细胞分泌的 TNF- α 表达明显减弱。见图 1。

3.6 对 T2DM 大鼠胰腺组织中 GRP78, ATF6 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠 GRP78, ATF6 蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 二甲双胍组、葛根各剂量组的 GRP78, ATF6 蛋白表达均明显下降 ($P<0.05$)。见图 2, 表 5。

4 讨论

T2DM 一般症状为体质量减轻、多饮、多食、多尿等, 研究表明, 肥胖的人患有 T2DM 的概率比正常人高, 并同时伴有 TC, TG 的升高^[15]。TNF- α 具有多种生物学功能, 不仅能参与正常的生理功能, 而且还在多种病理过程中发挥着重要的作用^[16]。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 葛根高剂量组; E. 葛根中剂量组; F. 葛根低剂量组 (图 2 同)

图 1 葛根对 2 型糖尿病大鼠胰腺中 TNF- α 的影响 (IHC, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Puerariae Lobatae Radix on TNF- α in pancreas of type 2 diabetic rats (IHC, $\times 200$)

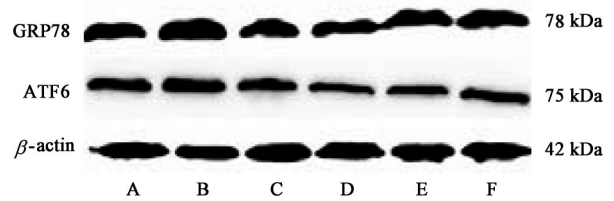


图 2 大鼠胰腺组织中 GRP78 和 ATF6 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of GRP78 and ATF6 protein expression in pancreatic tissues of rats

表 5 葛根对 2 型糖尿病大鼠胰腺组织中 GRP78 和 ATF6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 5 Effect of Puerariae Lobatae Radix on GRP78 and ATF6 protein expression in pancreatic tissues of type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GRP78/ β -actin	ATF6/ β -actin
正常	-	0.76±0.03	0.68±0.05
模型	-	0.95±0.04 ¹⁾	0.81±0.03 ¹⁾
二甲双胍	0.2	0.70±0.06 ²⁾	0.58±0.02 ²⁾
葛根	2.1	0.66±0.10 ²⁾	0.52±0.02 ²⁾
	1.4	0.64±0.02 ²⁾	0.54±0.03 ²⁾
	0.7	0.71±0.08 ²⁾	0.59±0.04 ²⁾

TNF- α 的持续释放就会引起机体发热, 休克及组织的损伤。TNF- α 导致 T2DM 胰岛素抵抗的机制主要是直接干扰胰岛素受体信号转导系统从而改变机体对胰岛素的敏感性; 同时又可以刺激其他细胞组

织产生代谢效应间接作用于胰岛素信号传导系统^[17],因此整个机体产生外周机体组织胰岛素抵抗,进而血糖升高。

本实验中,与模型组比较,二甲双胍组、葛根高、中、低剂量组的FBG,GSP,FINS,HOMA-IR,TNF- α 表达量显著降低,说明葛根具有降低血糖,GSP,FINS,减少机体炎症因子TNF- α 的释放,进而抑制机体IR的作用。比较葛根高、中、低剂量组,中剂量组抑制机体IR效果更强,说明葛根治疗T2DM最适宜剂量为40g。符合谈望晶等^[18]的葛根用以生津止渴、治疗消渴的临床剂量多为30~50g的结论。

机体依赖胰腺组织中的胰岛 β 细胞分泌胰岛素降低血糖,胰岛 β 细胞中存在高度发达的内质网。在大鼠喂养高糖高脂饲料联合腹腔注射STZ后,高强度的胰岛 β 细胞胰岛素分泌工作负荷导致ERS。GRP78是ERS中一个重要的分子伴侣蛋白,属于热休克蛋白家族成员,大量研究表明它在内质网相关疾病中大量表达,GRP78被认为是ERS发生和存在的标志蛋白^[19]。正常生理状态下,GRP78与3个感受蛋白PERK,IRE1,ATF6稳定结合,不存在生物活性。ATF6是一种II型内质网跨膜蛋白,主要分为ATF6 α 和ATF6 β 两种亚型,当ERS发生时,ATF6与GRP78解离,转位到高尔基体上被蛋白酶S1P和S2P切割,释放其胞质段(ATF6f)入核调节靶基因的表达,因此ATF6从无活性的复合物上解离,参与调节ERS相关基因的转录和表达^[20]。适度的GRP78,ATF6蛋白表达代表ERS稳定胰岛 β 细胞内质网稳态,保护胰岛 β 细胞,减轻机体组织胰岛素抵抗的程度,但长时间强烈的GRP78,ATF6蛋白表达会导致胰岛 β 细胞的功能障碍,诱导胰岛 β 细胞凋亡,加剧T2DM的恶化。

本实验通过观察药物干预后胰腺中ERS相关蛋白GRP78,ATF6的表达,结果表明,与正常组比较,模型组的GRP78,ATF6蛋白表达显著升高,说明模型组的T2DM内质网应激程度比正常组大鼠显著提高;与模型组比较,二甲双胍组及葛根各剂量组的GRP78,ATF6蛋白表达显著降低,葛根能减轻ERS程度与抑制GRP78,ATF6蛋白表达有关。

综上所述,此实验证实葛根可以降低血糖、减少炎症因子释放,降低GRP78,ATF6蛋白表达,减轻机体ERS的程度。

[参考文献]

[1] 闫忠红,刘勇,刘硕,等.葛根芩连汤对2型糖尿病大

鼠胰岛素抵抗及炎症因子的影响[J].长春中医药大学学报,2019,35(4):720-723.

- [2] 沈洁,周珊珊,万晓刚.黄连对2型糖尿病大鼠胰腺内质网应激PERK/ATF4/CHOP信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(16):50-55.
- [3] 孙华,李春燕,薛金涛.葛根的化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2019,36(11):1097-1101.
- [4] 曹毅.中药葛根的相关药理药效研究综述[J].中国处方药,2018,16(2):27-28.
- [5] 李祖寅,周志杰,晏滨,等.内质网应激在非酒精性脂肪肝肝病中的作用[J].中华肥胖与代谢病电子杂志,2020,6(2):122-126.
- [6] ZHONG J. Endoplasmic reticulum (ER) stress in the pathogenesis of type 1 diabetes[J]. Intech, 2013, 3(1): 24-38.
- [7] 肖辉.甘草黄酮对UVB诱导HaCaT细胞ERS中IRE1信号通路的影响[D].兰州:兰州大学,2016.
- [8] 陈晓萌,范田,孙俊,等.基于炎症学说探讨迎春花总黄酮对T2DM模型小鼠胰岛功能的影响及可能机制[J].中国药房,2019,30(22):3079-3083.
- [9] 徐国琴,孙涛,吴丽萍.内质网应激与糖尿病关系的研究进展[J].转化医学电子杂志,2018,5(1):48-52.
- [10] 裴丽娜,都健,刘慧蕾,等.二甲双胍对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织内质网应激的影响[J].中华糖尿病杂志,2012,11(4):367.
- [11] 李业琼,叶山东,翟丽敏,等.二甲双胍对2型糖尿病模型大鼠TNF- α 表达的影响[J].安徽医科大学学报,2016,51(9):1312-1315.
- [12] 金领微,潘敏,叶菡洋,等.二甲双胍通过调节氧化应激、内质网应激和自噬减轻大鼠肾缺血再灌注损伤的作用研究[J].医学研究杂志,2020,49(1):111-117.
- [13] 章成昌,谢光荣,姜玉涛,等.链脲菌素制备2型糖尿病大鼠模型的研究[J].安徽医药,2012,16(9):1241-1244.
- [14] 傅延龄,张林,刘绍永.葛根历代临床用量分析[J].中医杂志,2014,55(20):1773-1776.
- [15] 张霞.黄芪多糖对2型糖尿病胰岛素抵抗作用机制的研究[D].太原:山西医科大学,2011.
- [16] 向静,王宁,阿布力克木·吐尔地.炎症因子与小鼠肝脏胰腺胰岛素抵抗的关系研究[J].新疆医科大学学报,2011,34(1):5-8.
- [17] 黄鸣清.丹酚酸B改善型糖尿病大鼠IR作用及其机制研究[D].广州:广州中医药大学,2010.
- [18] 谈望晶,邸莎,赵林华,等.葛根的量效配伍及临床应用探讨[J].吉林中医药,2019,39(2):173-176.
- [19] 王远.枳实对内质网应激Cajal间质细胞GRP78、ATF6的影响[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [20] 程涵博,吕颂雅,刘勇.内质网应激在肝脏糖脂代谢及代谢性肝病中的作用[J].中国细胞生物学学报,2019,41(11):2209-2219.

[责任编辑 孙丛丛]