

五子降糖方对 T2DM 模型大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白表达的影响

王亚,董玉山,喇孝瑾,高秀娟,李继安*,王会敏,贺宝玲
(河北联合大学中医学院,河北唐山 063000)

[摘要] **目的:**观察五子降糖方对 2 型糖尿病模型大鼠血糖及骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 表达的影响,初步探讨其改善糖代谢的分子机制。**方法:**采用高脂饮食喂养 6 周联合 ip 小剂量链脲佐菌素 (STZ) 的方法建立 2 型糖尿病大鼠模型,随机分为模型组、二甲双胍 ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组、五子降糖方低、中、高剂量组 ($3.5, 7.0, 14.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设正常组,各组大鼠分别 ig 相应的药物,容量为 $7.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。模型组及正常组 ig 纯净水;二甲双胍组 ig 盐酸二甲双胍混悬液;五子降糖方低、中、高剂量组 ig 五子降糖方混悬液,干预 6 周。分别在 ig 前、ig 后 2 周、4 周、6 周测空腹血糖及餐后 2 h 血糖。ig 后 6 周处死大鼠,取其左后肢大腿股直肌组织,检测 GLUT4 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组 T2DM 大鼠空腹和餐后 2 h 血糖升高,骨骼肌 GLUT4 蛋白表达水平降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);五子降糖方能够降低 T2DM 大鼠空腹血糖及餐后 2 h 血糖水平,提高 T2DM 大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白表达水平,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**五子降糖方可降低 T2DM 模型大鼠空腹及餐后 2 h 血糖,作用机制可能与提高骨骼肌 GLUT4 蛋白表达水平有关。

[关键词] 五子降糖方; 2 型糖尿病; 血糖; 葡萄糖转运蛋白 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0193-04

[doi] 10.11653/syfy2013160193

Effects of Wuzi Jiangtang Fang on the GLUT4 Expression in Skeleton Muscle of Type 2 Diabetic Rats

WANG Ya¹, DONG Yu-shan, LA Xiao-jin, GAO Xiu-juan, LI Ji-an*, WANG Hui-min, HE Bao-ling
(Traditional Chinese Medicine College of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Wuzi Jiangtang Fang on blood glucose and the glucose transporter 4 (GLUT4) expression in skeleton muscle of type 2 diabetic model rats to explore the molecular mechanism of improving glucose metabolism. **Method:** The rat model of type 2 diabetes was established by feeding with high-fat diet for 6 weeks and intraperitoneal injection of small dose of streptozotocin (STZ). The diabetic rats were randomly divided into model group administrated with purified water, metformin group with metformin suspension, Wuzi Jiangtang Fang groups with water extracts of different doses respectively. Meanwhile, normal group was treated with purified water. The dose was $7.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight every day. The interventions were administrated by ig for 6 weeks. The fasting blood glucose and 2 h postprandial blood glucose were detected at the beginning of the treatment, and at the ends of the second, the fourth and the sixth week during the 6 weeks' treatment period respectively. At the end of the sixth week, the skeleton muscle was taken for the measurement of GLUT4 protein expression. **Result:** Compared with the normal group, the blood glucose levels of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats were elevated and the GLUT4 expression of skeleton muscle was decreased in T2DM model rats, with significant differences in all of the items above ($P < 0.05$); Wuzi Jiangtang Fang reduced the fasting blood glucose and 2 h postprandial blood glucose levels of T2DM model rats, and improved the GLUT4 expression

[收稿日期] 20130318(027)

[基金项目] 中国科技部国际科技合作项目(2008DFA31050)

[第一作者] 王亚,硕士研究生,从事中医糖脂代谢疾病研究,Tel: 0315-3726330,E-mail:wang-shuyu@qq.com

[通讯作者] *李继安,Tel:0315-3726292,E-mail:lnyy@vip.sina.com

in skeleton muscle of T2DM model rats. The differences regarding the item examined above all had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wuzi Jiangtang Fang can decrease the fasting blood glucose and 2 h postprandial blood glucose of T2DM model rats, which may be related with the improvement of GLUT4 expression in skeleton muscle of T2DM model rats.

[**Key words**] Wuzi Jiangtang Fang; type 2 diabetes mellitus; blood glucose; GLUT4

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 重要的病理基础, 因此, 提高胰岛素敏感性增强其生物学效应是治疗 2 型糖尿病的有效途径^[1]。葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 是胰岛素信号转导中的关键蛋白, 存在于骨骼肌、脂肪和心肌等组织中, 在葡萄糖吸收利用中起重要作用。有研究显示, T2DM 患者的肌细胞 GLUT4 mRNA 和蛋白水平均显著降低, 因此 GLUT4 蛋白合成和基因转录异常被认为是 T2DM 胰岛素抵抗的重要分子基础。前期实验研究发现, 以补肾气, 化痰浊为主要治疗原则的五子降糖方具有明显改善 T2DM 糖代谢作用。为了进一步探讨其作用机制, 本实验研究了该方对 T2DM 模型大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白含量的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 70 只, 体重 (200 ± 10) g, 购自天津市山川红实验动物科技有限公司, 许可证 SCXK (津) 2009-0001, 合格证号 0253756。饲养于河北联合大学 10 000 级屏障环境动物实验室 [SYXK (冀) 2010-0038, 使用证明 MY10DXK07], 室温 20 °C, 相对湿度 45%, 光暗周期 (12 h/12 h)。

1.2 药物 菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam., 女贞子 *Ligustri lucidi Fructus*, 紫苏子 *Perilla frutescens*, 莱菔子 *Raphanus sativus* L., 车前子 *Plantago asiatica* L. 购于北京同仁堂唐山连锁药店有限公司, 由河北联合大学药学院劳风云教授鉴定为正品, 按 3:3:2:2:2 的比例混合, 加 8 倍量水煎煮 2 h, 共煎煮 2 次, 将 2 次药液混合, 加热浓缩收膏, 收膏率 20.29%, 分装密封后置于冰箱内冷冻备用, 临用时加入纯净水配成不同浓度的混悬液; 二甲双胍片 (上海中美施宝有限公司)。

1.3 试剂 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 B56981); 小鼠抗大鼠 GLUT4 抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 批号 2213); 硝酸纤维素膜 (NC 膜, 美国 Millipore 公司, 批号 HATF00010); Western 及 IP 细胞裂解液 (批号 P0013); PMSF (100 mmol·L⁻¹, 批号 ST506), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型,

批号 P0010), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (批号 P0012A); 预染标准蛋白 Marker (批号 P0068); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 A0216), 均为碧云天生物公司产品。

1.4 仪器 2BE-70-25 型制冰机 (德国, ZIGERA), IKA-T10 basi 均浆机 (美国, IKA 公司), R134A 低温高速离心机 (Eppendorf), Tecan 酶标仪 (瑞士, Infinite F50), 多功能电泳仪 (北京六一仪器厂), 水平摇床 (美国, GFL), 暗盒、X 感光胶片 (日本 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 大鼠 2 型糖尿病模型制备与分组 70 只 Wistar 雄性大鼠适应性喂养 1 周, 随机抽取 10 只作为正常组 (C 组), 给予普通饲料喂养。其余 60 只大鼠给予高脂饲料 (脂肪 41%, 蛋白 17%, 碳水化合物 42%, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司) 喂养, 6 周后, 予 STZ 溶液 40 mg·kg⁻¹ ip, 隔日再次予 STZ 溶液 30 mg·kg⁻¹ ip, 每次注射 STZ 前禁食水 12 h, 注射后继续高脂饲料喂养, 正常组予同剂量的缓冲液 ip, 第 2 次 STZ ip 后 1 周, 所有动物测空腹血糖及餐后 2 h 血糖。以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹、餐后血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 为成模标准^[2], 共成模 54 只, 排除餐后血糖 ≥ 30.0 mmol·L⁻¹ 的 4 只, 选择 50 只随机分为: 五子降糖方低、中、高剂量组 (WD, WZ, WG 组)、二甲双胍组 (D 组)、模型组 (M 组), 每组 10 只。

2.2 给药及取材 分组后, 各组大鼠分别 ig 相应的药物, 给药剂量按大鼠与人的换算公式计算^[3], ig 7.5 mL·kg⁻¹。模型组及正常组 ig 纯净水; 二甲双胍组 ig 0.1 g·kg⁻¹ 盐酸二甲双胍混悬液; 五子降糖方低、中、高剂量组 ig 五子降糖方混悬液, 折合生药剂量分别为 3.5, 7.0, 14.0 g·kg⁻¹。每周动物称重 1 次, 以调整用药量, 共给药 6 周。ig 6 周后, 禁食 12 h, ip 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血。处死大鼠, 迅速取左后肢大腿股直肌组织, 生理盐水冲洗后, 置于液氮中冷冻保存。

2.3 检测项目与方法

2.3.1 空腹血糖及餐后 2 h 血糖 利用唐博士血

糖仪,葡萄糖氧化酶法测定实验大鼠空腹血糖和餐后 2 h 血糖。

2.3.2 Western blot 测定骨骼肌组织 GLUT4 蛋白含量 取 100 mg 肌肉组织,加入 1 mL Western 及 IP 细胞裂解液(加入 10 μL PMSF)裂解,BCA 法测定组织蛋白浓度。上样 100 μg 蛋白,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至 NC 膜上。孵育小鼠来源 GLUT4 第一抗体或者 GAPDH 第一抗体,4 ℃ 过夜。孵育 HRP 标记的山羊抗小鼠第二抗体,室温 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 GLUT4 和 GAPDH 灰度, GLUT4 蛋白表达水平用 GLUT4 和 GAPDH 灰度比值表示。

2.3.3 统计学处理 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 正常对照组大鼠实验过程中情况

良好,毛色光滑,大便正常;模型组 T2DM 大鼠出现明显多饮、多尿,毛色无泽,精神萎靡,体重明显减轻;二甲双胍组 T2DM 大鼠较模型组症状改善;五子降糖方组 T2DM 大鼠较模型组症状改善明显(ig 后 6 周检测葡萄糖耐量时,由于 ig 操作不当,五子降糖方中剂量组大鼠死亡 1 只,未采集到标本)。

3.2 对模型大鼠空腹血糖的影响 给药前模型及各治疗组间空腹血糖未见统计学差异,但均较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。给药 2 周后模型及各治疗组空腹血糖较给药前均显著升高 ($P < 0.05$)。给药 4,6 周后各治疗组较模型组空腹血糖降低 ($P < 0.01$),其中五子降糖方各剂量组降糖效果明显 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对模型大鼠餐后 2 h 血糖的影响 给药前模型及各治疗组间餐后 2 h 血糖未见统计学差异,但均较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。给药 2,4,6 周后,五子降糖方各剂量组餐后 2 h 血糖水平较模型组明显降低 ($P < 0.05$)。其中给药 2,4 周后五子降糖方各剂量组较二甲双胍组餐后 2 h 血糖降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 五子降糖方对模型大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	空腹血糖/mmol·L ⁻¹			
		给药前	给药后 2 周	给药后 4 周	给药后 6 周
正常	-	4.4 ± 0.26	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.4
模型	-	15.9 ± 2.3 ¹⁾	25.4 ± 3.5 ¹⁾	24.1 ± 2.6 ¹⁾	21.5 ± 3.4 ¹⁾
二甲双胍	0.1	15.8 ± 1.4 ¹⁾	21.5 ± 2.4	18.0 ± 2.4 ²⁾	11.5 ± 2.7 ³⁾
五子降糖方	3.5	15.4 ± 0.85 ¹⁾	23.6 ± 4.3	8.2 ± 1.1 ^{3,4)}	7.1 ± 1.9 ^{3,4)}
	7.0 ⁵⁾	15.4 ± 0.97 ¹⁾	21.9 ± 1.7	10.9 ± 2.1 ^{3,4)}	6.8 ± 0.9 ^{3,4)}
	14.0	15.9 ± 1.3 ¹⁾	23.9 ± 2.1	6.9 ± 1.1 ^{3,4)}	5.9 ± 1.4 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与二甲双胍组比较⁴⁾ $P < 0.05$;⁵⁾ 五子降糖方中剂量组第 6 周 $n = 9$ (表 2~3 同)。

表 2 五子降糖方对模型大鼠餐后 2 h 血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	餐后 2 h 血糖/mmol·L ⁻¹			
		给药前	给药后 2 周	给药后 4 周	给药后 6 周
正常	-	6.8 ± 0.6	5.9 ± 1.0	6.4 ± 0.8	5.9 ± 1.1
模型	-	23.1 ± 5.4 ¹⁾	24.4 ± 4.4 ¹⁾	24.7 ± 3.2 ¹⁾	25.2 ± 2.9 ¹⁾
二甲双胍	0.1	21.5 ± 4.1 ¹⁾	25.7 ± 3.2	25.4 ± 3.5	14.5 ± 1.7 ³⁾
五子降糖方	3.5	23.5 ± 3.5 ¹⁾	20.2 ± 2.7 ^{2,4)}	18.4 ± 3.1 ^{3,4)}	18.0 ± 1.3 ³⁾
	7.0 ⁵⁾	23.0 ± 3.2 ¹⁾	15.8 ± 3.5 ^{3,4)}	14.9 ± 1.4 ^{3,4)}	14.5 ± 1.7 ³⁾
	14.0	23.8 ± 2.2 ¹⁾	18.9 ± 2.6 ^{3,4)}	15.2 ± 1.7 ^{3,4)}	14.4 ± 2.1 ³⁾

3.4 对模型大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白含量的影响 GLUT4 蛋白在模型组中的表达较正常组明显降低

($P < 0.01$),仅为正常组的 29.68%;用药物治疗后 GLUT4 蛋白的表达较模型组明显升高 ($P < 0.01$)

(双胍组、五子低、中、高剂量组约为模型组的 2.49, 2.30, 2.54, 2.98 倍), 但二甲双胍、五子低、中剂量治疗组仍明显低于正常组 ($P < 0.05$) (双胍组、五子低、中剂量组约为正常组的 73.89%, 68.31%, 75.40%)。见图 1, 表 3。

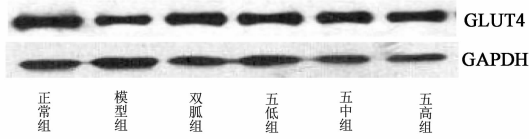


图 1 五子降糖方对 T2DM 模型大鼠骨骼肌 GLUT4 表达的影响

表 3 五子降糖方对 T2DM 模型大鼠骨骼肌 GLUT4 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLUT4/GAPDH 蛋白灰度比值
正常	-	3.061 4 ± 0.314 4
模型	-	0.908 7 ± 0.207 8 ¹⁾
二甲双胍	0.1	2.262 1 ± 0.231 4 ³⁾
五子降糖方	3.5	2.091 3 ± 0.253 0 ³⁾
	7.0 ⁵⁾	2.308 2 ± 0.425 9 ³⁾
	14.0	2.711 9 ± 0.316 7 ^{3,4)}

4 讨论

五子降糖方以 T2DM 肾虚、痰浊立论^[4-5], 由《奇效良方》的茯菟丹和《韩氏医通》的三子养亲汤化裁组成, 方中菟丝子平补肾阴肾阳, 温而不燥, 补而不滞; 女贞子平补肝肾, 养阴而不腻滞。二者合用使肾之阴阳得补, 肾气得充, 进而蒸腾、气化推动和调节胃之“游溢精气”、脾之“散精”、肺之“通调水道”, 使津液输布代谢正常, 则痰浊无以内生。紫苏子降气消痰、润肠, 莱菔子消食导滞、降气化痰。车前子渗湿利尿、祛痰。五药配伍调阴阳、增气化使肾虚得补, 畅气机、行津液使痰浊得化。现代药理实验表明五子降糖方的多味中药均有一定的改善糖、脂代谢的作用^[6-7]。

骨骼肌是利用葡萄糖和维持血糖平衡的重要组织, 胰岛素刺激下的葡萄糖摄取约 80% 是由骨骼肌完成的^[8]。而胰岛素刺激下的葡萄糖转运是骨骼肌葡萄糖代谢的限速步骤, 由胰岛素敏感的 GLUT4 完成。GLUT4 是葡萄糖转运蛋白家族的成员之一, 没有刺激时, 90% 以上的 GLUT4 分布于细胞内的储存囊泡中, 在胰岛素或运动刺激下, GLUT4 从细胞囊泡内转位至细胞膜上, 从而转运更多的葡萄糖进

入细胞内, 刺激消失后, 细胞膜则通过内吞功能把 GLUT4 从细胞外膜运回细胞内并贮存于囊泡中。大量的实验研究表明, 糖尿病时 GLUT4 的异常变化常被认为是 T2DM 高血糖的重要分子基础^[9]。

本实验结果显示: T2DM 模型大鼠骨骼肌组织 GLUT4 的含量明显下降, 说明 T2DM 模型大鼠骨骼肌中存在 GLUT4 蛋白表达异常。五子降糖方具有良好降糖作用, 并且明显增加 T2DM 模型大鼠骨骼肌 GLUT4 蛋白表达水平。因此, 推测五子降糖方降低空腹及餐后血糖与增加骨骼肌组织内 GLUT4 的蛋白水平有关。但胰岛素信号转导比较复杂, 多种途径(如: PI3K 通路、MAPK 通路; c-Cbl 通路)均可对 GLUT4 进行调节^[10]。五子降糖方通过哪条信号转导通路影响 GLUT4 的蛋白水平尚需做进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 许曼音. 糖尿病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 277.
- [2] 刘德慧, 邢翔飞. 2 型糖尿病大鼠模型的特点及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 212.
- [3] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 357.
- [4] 潘明政, 李玲, 李鲲. 糖尿病患者中医证候特点及其相关因素探讨[J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2006, 13(4): 6.
- [5] 徐正正. 不同病程糖尿病患者的证候特征[J]. 中医杂志, 2000, 41(1): 44.
- [6] 徐先祥, 李道中, 彭代银, 等. 菟丝子多糖改善糖尿病大鼠糖脂代谢作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 232.
- [7] 高大威, 李青旺, 刘志伟, 等. 女贞子中齐墩果酸抗糖尿病效果研究[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1619.
- [8] 陈梦华, 凌宏艳, 周寿红, 等. 槟榔碱上调高果糖诱导胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 GLUT-4 和 p-PI3K 的表达[J]. 南华大学学报: 医学版, 2012, 40(1): 17, 46.
- [9] Park S T, Kim K, Yoon J H, et al. Effect of exercise on GLUT4 expression of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J EP on Line, 2011, 14(4): 113.
- [10] T. Barry Levine, Arlene Bradley Levine. 代谢综合征与心血管疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[责任编辑 聂淑琴]