

# 助脾散精方对 IR 模型大鼠胰岛素信号通路相关蛋白及胰岛素降解酶的影响

第五永长<sup>1\*</sup>, 许建泰<sup>2</sup>, 贾妮<sup>1</sup>

(1. 陕西中医学院中医临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省第二人民医院, 西安 710061)

**[摘要]** 目的: 观察助脾散精方(ZPSJ)对胰岛抵抗(IR)模型大鼠胰岛素信号通路相关蛋白胰岛素受体(InsR)、胰岛素受体底物-1(IRS-1)及胰岛素降解酶(IDE)的影响。方法: SD大鼠尾iv链脲佐菌素(STZ)加高糖高脂饮食复制IR模型, 分为正常组、模型组、罗格列酮组(罗格列酮 $7.2 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和ZPSJ治疗组(含生药 $6.41 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。结果: IR模型组大鼠海马CA1区InsR、IRS-1阳性表达的神经元明显增多, ZPSJ治疗组, InsR、IRS-1表达明显减少( $P < 0.01$ )。IR模型组大鼠海马CA1区IDE阳性表达的神经元明显减少, ZPSJ治疗组IDE表达明显增加, 与模型组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。结论: ZPSJ方能减少IR模型大鼠海马组织InsR、IRS-1的表达, 同时增加海马组织IDE的表达。

**[关键词]** 胰岛素抵抗; 胰岛素信号通路蛋白; 胰岛素降解酶; 助脾散精方

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0210-03

胰岛素抵抗(IR)是诸多心脑血管疾病的共同病因。IR与老年性痴呆的关系越来越引起国内外学者的关注。国外应用胰岛素(Ins)增敏剂治疗阿尔茨海默病(AD)及轻度认知损害(MCI)取得了较好的效果, 但其机制不明<sup>[1]</sup>。阐明IR与AD认知损害关系的机制、探索通过胰岛素增敏途径改善AD样认知记忆障碍, 对于发挥中医药优势、中西医结合防治AD及IR相关性心脑血管疾病非常重要。本实验以具有改善胰岛素敏感性作用的中药复方助脾散精方(ZPSJ)为干预药物做了初步的对照研究。

## 1 材料与方

**1.1 药物与试剂** ZPSJ由人参、苍术、黄连等药物组成, 水煎醇沉提取物由陕西中医学院附属医院制剂中心代加工(1g提取物相当于2.94g生药); 罗格列酮(葛兰素史克, H20031082); 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, Merck公司, 批号K0050); 免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号PK-4001); 胰岛素受体(InsR)抗体、胰岛素受体底物-1(IRS-1)抗体、胰岛素降解酶(IDE)抗体(武汉博士德生物工程公司)。

**1.2 仪器** 石蜡冷冻切片机(DQP-9010型, 上海天

缘医用生物有限公司), 自动脱水机(ZT-12J型, 上海华岩仪器设备有限公司), BX-15生物光学显微镜(Olympus公司), Motic Med 6.0数码医学图像分析系统(Motic公司)。

**1.3 造模与分组** 健康雄性清洁级SD大鼠60只, 约2月龄, 由第四军医大学实验中心提供, 合格证号SCXK(军)2007-007。大鼠适应性喂养1周后, 随机取45只大鼠按剂量 $30 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次iv STZ, 普通饲料喂养2周, 行口服葡萄糖耐量试验(OGTT), 筛选糖耐量异常者, 随机分成3组: ZPSJ提取物治疗组、罗格列酮组、模型组。ZPSJ组(含生药 $6.41 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )罗格列酮组( $7.2 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 模型组(含5%羧甲基纤维素的PBS溶液)均ig, 1次/d。给药容量均为 $10 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。以上3组在治疗期间喂高糖高脂饮食 蔗糖: 猪油: 奶粉: 鸡蛋: 普通饲料 30: 20: 4: 2: 63(质量比)。正常组普通饲料喂养。连续10周。末次药后禁食12h行OGTT, 大鼠ig葡萄糖 $2.2 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 前及后1, 2h分别经断尾采血, 测其空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(Fins)、葡萄糖负荷后1h血糖(BG-1h)、2h血糖(BG-2h)。以判定造模是否成功。OGTT结束后继续饲养1周。

**1.4 免疫组化方法检测 InsR, IRS-1, IDE 表达** 首先进行动物灌注固定: 按 $4.0 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 10%水合氯醛麻醉大鼠, 麻醉成功后, 仰卧固定于平台, 剪开胸腹充分暴露心脏和肝脏。迅速插导管于左心室至升主动脉并固定, 同时剪开右心耳。快速灌注生理盐水1000mL至肝脏完全变白, 右心室流出澄清液

**[收稿日期]** 2011-08-09

**[基金项目]** 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2009JM4001)

**[通讯作者]** \* 第五永长, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事老年神经、血管疾病危险因素、发病机制与中西医结合防治, Tel: 029-38185129, E-mail: ycdw07@yahoo.com.cn

体后,更换 4% 多聚甲醛先快后慢继续灌注 30 min,然后断头,完整取出鼠脑,置固定液中,24 h 后行石蜡包埋切片。每只大鼠海马 CA1 区连续冠状切片,放入 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBST 溶液中进行免疫组化染色。分析免疫组化片阳性细胞数、阳性染色面积、阳性染色部位的平均吸光度(A),比较各组 InsR, IRS-1, IDE 的表达情况。

**1.4 统计学处理** 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 软件处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 InsR, IRS-1 免疫组织化学染色** 模型组大鼠海马 CA1 区 InsR, IRS-1 阳性表达的神经元明显增多,与正常组比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),高倍镜下,胞浆呈深染;ZPSJ 方组 InsR, IRS-1 表达明显减少( $P < 0.01$ ),罗格列酮组和 ZPSJ 治疗组比较,无显著性差异(表 1, 2)。

表 1 ZPSJ 对模型大鼠海马 CA1 区 InsR 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	阳性细胞 /个	阳性染色面积 /μm <sup>2</sup>	A
正常	-	70.88 ± 6.72 <sup>1)</sup>	19 763.82 ± 119.32 <sup>1)</sup>	113.87 ± 1.29 <sup>1)</sup>
模型	-	110.32 ± 9.23	27 813.46 ± 126.55	178.94 ± 1.69
罗格列酮 7.2 × 10 <sup>-4</sup>		81.36 ± 8.12 <sup>1)</sup>	20 135.38 ± 114.21 <sup>1)</sup>	121.76 ± 1.24 <sup>1)</sup>
ZPSJ	6.41	86.21 ± 7.96 <sup>1)</sup>	21 893.66 ± 121.33 <sup>1)</sup>	136.31 ± 1.63 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 ZPSJ 对模型大鼠海马 CA1 区 IRS-1 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	阳性细胞 /个	阳性染色面积 /μm <sup>2</sup>	A
正常	-	75.85 ± 8.29 <sup>1)</sup>	20 368.31 ± 112.91 <sup>1)</sup>	126.31 ± 1.68 <sup>1)</sup>
模型	-	116.22 ± 10.76	29346.25 ± 138.32	192.35 ± 1.37
罗格列酮 7.2 × 10 <sup>-4</sup>		89.16 ± 11.38 <sup>1)</sup>	23 214.32 ± 123.64 <sup>1)</sup>	131.34 ± 1.38 <sup>1)</sup>
ZPSJ	6.41	91.32 ± 12.36 <sup>1)</sup>	24 316.21 ± 126.39 <sup>1)</sup>	136.61 ± 1.46 <sup>1)</sup>

**2.2 IDE 免疫组织化学染色** 模型组大鼠海马 CA1 区 IDE 阳性表达的神经元明显减少,与正常组比较有显著性差异( $P < 0.01$ );ZPSJ 方组 IDE 表达明显增加,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),罗格列酮组和 ZPSJ 组比较,无显著性差异(表 3)。

## 3 讨论

近年来大量研究认为,IR 在 AD 的发生、发展中起着重要作用<sup>[2]</sup>,IR 增加了年龄相关性记忆损害

及 AD 的危险<sup>[3]</sup>。IR 在引起糖、脂肪、蛋白质等多种物质代谢障碍的同时对不溶性淀粉样蛋白 Aβ 沉积、毒性及 tau 蛋白磷酸化起促进作用<sup>[4]</sup>。因此,Ins/InsR 信号通路调节异常促进了 AD 及糖尿病脑病的发病及进展。国内盛树力等以糖尿病鼠为模型研究认为,2 型糖尿病存在中枢 Ins 信号转导的异常<sup>[5-6]</sup>,这也给 IR 以及糖尿病通过 Ins 信号转导通路促进 AD 发病提供了重要证据。

表 3 ZPSJ 对模型大鼠海马 CA1 区 IDE 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	阳性细胞数 /个	阳性染色面积 /μm <sup>2</sup>	A
正常	-	65.32 ± 9.31 <sup>1)</sup>	16 239.16 ± 97.12 <sup>1)</sup>	164.34 ± 1.98 <sup>1)</sup>
模型	-	26.13 ± 8.26	8 125.21 ± 79.31	93.31 ± 1.26
罗格列酮 7.2 × 10 <sup>-4</sup>		50.39 ± 8.10 <sup>1)</sup>	11 598.33 ± 92.64 <sup>1)</sup>	119.26 ± 1.68 <sup>1)</sup>
ZPSJ	6.41	62.29 ± 9.18 <sup>1)</sup>	13 363.24 ± 94.31 <sup>1)</sup>	161.25 ± 1.59 <sup>1)</sup>

本实验研究表明,IR 模型大鼠脑组织海马部位出现了 InsR 和 IRS-1 表达的明显增加,这种情况可能是神经元对于 Ins 减少的一种适应性反应,即神经元以较多的 InsR, IRS-1 来充分利用已经减少的 Ins。而经过 ZPSJ 治疗后 InsR, IRS-1 表达明显下降。这一结果反映了 ZPSJ 方在体内影响了中枢 Ins 信号转导通路,可能促进了中枢 Ins 的增加或利用,亦或起到类似 Ins 的神经营养因子样作用,有关其深层次作用机制需进一步深入研究。

另有研究证明,IDE 是一种淀粉样蛋白(Aβ)代谢降解酶,通过降解 Aβ 从而减少 Aβ 低聚物的形成。有研究认为<sup>[7]</sup>,Ins 介导的 PI3-K/PKB 信号途径参与对 IDE 活性的调节,继而影响 Aβ 在胞外的降解。IR 时,外周的高 Ins 血症下调了 Ins 向中枢组织的运输,脑组织 Ins 水平下降。神经元内 Aβ 释放被抑制,IDE 水平降低,进一步促进了神经元内 Aβ 的堆积及寡聚化<sup>[3]</sup>。另外,有研究证实,Aβ 及其前体 APP 与 Ins 都是胰岛素降解酶 IDE 的作用底物,IDE 能够降解神经元及小胶质细胞中的 Aβ,减低其神经毒性,破坏了 IDE 基因的大鼠脑内出现极显著的、慢性的 Aβ 聚集<sup>[8]</sup>。在 AD 病人中,Aβ 聚集越多,消耗 IDE 越多,拮抗胰岛素作用也越强,从而促进和加重 IR。

本实验结果显示:IR 模型大鼠海马组织 IDE 的表达明显减少,经 ZPSJ 治疗后 IDE 表达明显增多。这一结果提示,ZPSJ 能通过增加海马组织 IDE 表达,促进脑内 Aβ 的降解,从而可能起到减轻 Aβ

# 当归贝母苦参煎剂对实验性慢性细菌性前列腺炎大鼠前列腺 TNF- $\alpha$ 的影响

何丽清<sup>1\*</sup>, 傅延龄<sup>2</sup>, 马艳红<sup>2</sup>, 曹峰<sup>2</sup>, 刘小河<sup>2</sup>

(1. 山西中医学院基础部伤寒教研室, 太原 030024; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 观察当归贝母苦参煎剂对慢性细菌性前列腺炎(CBP)大鼠前列腺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的免疫组化和 mRNA 表达的影响, 探讨其可能的作用机制。方法: 雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为空白对照组、模型组、诺氟沙星组、当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量组 6 组, 每组 10 只, 前列腺背叶注射大肠埃希菌制备 CBP 动物模型。当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量分别为 11.67, 5.83, 2.92 g·kg<sup>-1</sup>, 诺氟沙星剂量为 9.3 × 10<sup>-2</sup> g·kg<sup>-1</sup>。术后第 15 天起用药, 连续 4 周。用免疫组化法观测大鼠前列腺组织中的 TNF- $\alpha$  表达, 用 RT-PCR 法测大鼠前列腺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达。结果: 与模型组比较, 当归贝母苦参煎剂各剂量组 TNF- $\alpha$  免疫组化阳性表达和 mRNA 基因表达均明显降低( $P < 0.01$ ), 其中高剂量组最低。结论: 当归贝母苦参煎剂治疗慢性细菌性前列腺炎的作用机制可能与减少 TNF- $\alpha$  的产生有关。

**[关键词]** 当归贝母苦参煎剂; 慢性细菌性前列腺炎; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0212-03

## The Effects of Danggui Beimu Kushen Decoction on TNF- $\alpha$ in Prostates in Rats with Chronic Bacterial Prostatitis

HE Li-qing<sup>1\*</sup>, FU Yan-ling<sup>2</sup>, MA Yan-hong<sup>2</sup>, CAO Feng<sup>2</sup>, LIU Xiao-he<sup>2</sup>

(1. Shanxi College of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[收稿日期]** 2011-09-19

**[通讯作者]** \* 何丽清, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医临床基础研究, Tel: 0351-2272046, E-mail: hlqyx@163.com

沉积及其神经毒性、防止 SAD 样病理改变的作用。有关这一作用机制有待进一步深入探讨。

### [参考文献]

- [1] Watson G S, Cholerton B A, Reger M A, et al. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone [J]. *Am J Geriatr Psychiat*, 2005, 13: 950.
- [2] Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications [J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2006, 20: 298.
- [3] Suzanne Craft. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment [J]. *Current Alzheimer Research*, 2007, 4: 147.
- [4] 姚玉惠, 程琦. 胰岛素及胰岛素抵抗与阿尔茨海默病 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35 (3): 287.
- [5] 盛树力. 胰岛素与散发性老年性痴呆 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 226.
- [6] 庄晓明, 穆珺, 李然, 等. APP17 肽对糖尿病 KK 小鼠海马神经元胰岛素信号转导途径的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2007, 28 (3): 275.
- [7] Zhao L, Teter B, Morihara T, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention [J]. *J Neuroscience*, 2004, 24: 11120.
- [8] Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid $\beta$ -protein and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo* [J]. *PNAS*, 2003, 100 (7): 4162.

[责任编辑 何伟]