

黄芪葛根汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗 及 PPAR- γ mRNA 表达的影响

王春怡, 李卫民, 高英*

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 观察黄芪葛根汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及脂肪组织中过氧化物酶体增生物激活受体- γ (PPAR- γ) mRNA 表达的影响。方法: 雄性 SD 大鼠高脂饲料喂养 4 周后注射小剂量链脲佐菌素, 1 周后测定大鼠空腹血糖 (FBG) 及糖负荷 2 h 后血糖 (2 h BG), 选择 FBG 正常及 2 h BG ≥ 7.8 mmol·L⁻¹ 者为模型大鼠。取模型大鼠, 随机分为模型对照组、罗格列酮组, 黄芪葛根汤高、中、低剂量组, 另设正常对照组, 药物干预 8 周后, 测定 FBG, 空腹胰岛素水平 (FINS), 血浆瘦素 (Leptin), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 计算胰岛素敏感指数 (ISI) 和抵抗指数 (HOMA-IR), 提取大鼠网膜脂肪组织总 RNA, 采用逆转录 PCR 技术扩增 PPAR- γ 基因片段, 检测其基因表达水平。结果: 黄芪葛根汤能提高模型大鼠 ISI, 降低 HOMA-IR 指数, 降低 Leptin 和 TNF- α 水平, 增加 PPAR- γ mRNA 表达。结论: 黄芪葛根汤对大鼠 IR 具有显著的改善作用, 其机制可能与降低血浆 Leptin, TNF- α 水平, 提高脂肪组织 PPAR- γ mRNA 表达有关。

[关键词] 黄芪葛根汤; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 过氧化物酶体增生物激活受体- γ ; 瘦素; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0152-04

Effect of Huangqi Gegen Decoction on Insulin Resistance and Gene Expression of PPAR- γ in Type 2 Diabetes Mellitus Rats

WANG Chun-yi, LI Wei-min, GAO Ying*

(School of Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Huangqi Gegen decoction on insulin resistance (IR) and gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Method:** Male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group. The rats of normal group were fed with common food while the others with high calorie food for 4 weeks and injected with low dose of STZ. The level of fasting blood glucose (FBG) and 2 hours blood glucose (2 h BG) of glucose load were measured by routine method in rats with hyperlipemia after one week. The rats with normal FBG level and 2 hBG level ≥ 7.8 mmol·L⁻¹ were as model rats. The model rats were randomly divided into model group, rosiglitazone group, and high, middle, low dose of Huangqi Gegen decoction groups (8, 4, 2 g·kg⁻¹). After intervention by drugs for 8 weeks, FBG, fasting insulin (FINS), leptin, TNF- α level of all rats were measured and insulin sensitivity index (ISI), insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated accordingly. At the end of experimental treatment, the total mRNA of greater omental adipose tissues were extracted and the genic fragments of PPAR- γ were amplified in order to detect their expression levels. **Result:** Huangqi Gegen decoction could enhance ISI, reduce HOMA-IR, plasma Leptin and TNF- α level in model rats, and increase the expression of PPAR- γ mRNA. **Conclusion:** Huangqi Gegen decoction can improve IR condition of the model rats and its mechanism is probably related to its effect of reducing plasma leptin and TNF- α level, enhancing the genic expressional level of PPAR- γ .

[收稿日期] 20110729(006)

[基金项目] 广东省科技计划社会发展类项目(2010B030700058); 广东省中医药局科研课题(2010412)

[第一作者] 王春怡, 博士, 讲师, 从事新药研究与开发, Tel: 020-39358044, E-mail: vip_wangchunyi@gzhtcm.edu.cn

[通讯作者] * 高英, 硕士生导师, 主任中药师, 从事新药研究与开发, Tel: 020-39358290, E-mail: vip_gaoying@gzhtcm.edu.cn

[Key words] Huangqi Gegen decoction; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; PPAR- γ ; leptin; TNF- α

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是糖尿病重要的发病机制之一,贯穿于糖尿病的发生、发展全过程,同时也是导致糖尿病并发症的“动力”根源。目前已知核转录因子过氧化物酶体增生物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ)与IR密切相关^[1],是胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类(TZDs)药物的作用靶点。近年来研究发现,部分中药有作为PPAR- γ 激动剂、改善IR的潜能,因此,PPAR- γ 也可以作为一个比较好的切入点,并且有望在中医药领域研究出新的、特异性较高的PPAR- γ 激动剂。

黄芪葛根汤见于《证治汇补》。临床可用于气阴两虚之高血压、糖尿病、中风后遗症等。本课题组前期的研究表明黄芪葛根汤可以通过降糖、降脂、增加胰岛素敏感性、抑制FFA的过度生成以及对胰腺组织的保护作用而发挥其改善2型糖尿病(T2DM)及IR的症状^[2],为进一步探讨其改善IR的作用机制,本实验观察了黄芪葛根汤对小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)加高脂饲料诱导的T2DM-IR模型大鼠血浆瘦素(leptin)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)以及脂肪组织PPAR- γ mRNA基因表达的影响,以探讨其干预T2DM-IR的作用机制和靶点,为其临床应用及研究奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重(180~220)g,SPF级,批号0034927,合格证号粤监证字2008A020,广东省医学实验动物中心。动物饲养于广东药学院药理教研室动物房,室内温度(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度50%~70%,饲养环境符合医学实验动物环境设施要求,SPF级饲料由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 仪器 SN-695B型放免 γ 测量仪(上海原子核所日环仪器厂),AV5421型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司),Gene Quant pro核酸仪(Amersham bioscience),AL1296 DNA Eng-ine(BIO-RAD公司),EPS301电泳仪(Amersham Bioscience),图像捕获系统VTLBER LOURMAT0614503(Amersham Bioscience),SIM-F140型碎冰/制冰机(日本SANYO公司),1-15k型冷冻离心机(美国Sigma公司),RH basic KT/C磁力搅拌器(IKA公司),RIOS纯水机(MILLIPORE公司),OIJ 2003-05立式沸反压力蒸气灭菌器筒(上海博迅实业有限公

司)。

1.3 药物 黄芪葛根汤提取物,黄芪:葛根比例为2:1。采用70%乙醇提取,回收溶剂,大孔树脂纯化,每1g相当于生药1.71g,密度1.22(50 $^{\circ}$ C),由研究室自行制备;盐酸罗格列酮,规格4mg/片,贵州圣济堂制药有限公司,批号20070502;链脲佐菌素(STZ),美国Sigma公司,临用前用柠檬酸缓冲盐配制,pH 4.4。

1.4 试剂 血糖试剂盒,上海科华生物工程股份有限公司,批号080222;胰岛素放免试剂盒,北京科美东雅生物技术有限公司,批号080829;TNF- α 放免试剂盒、Leptin放免试剂盒,北京普尔伟业生物技术有限公司,批号080829;DNA MarkerI;PCR试剂盒,批号H6604;TRNZOL-A⁺,批号H6124;TIANScript cDNA第一链合成试剂盒;Goldview溶液(EB替代染料),上述试剂均为北京天根生物技术有限公司产品;DEPC,法国Fluka公司,批号071210;异丙醇、氯仿、无水乙醇均为分析纯,天津大茂化学试剂厂。

1.5 饲料 高脂饲料配方组成:基础饲料52%,酪蛋白12%,蔗糖10%,猪油24%,磷酸氢钙2%,复合多维0.1%,矿物质0.4%,盐0.2%,共100.7%。由广东省医学实验动物中心加工,委托加工编号20080421。SPF级大鼠基础饲料由广东省医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 模型建立与分组^[3-4] 雄性SD大鼠,在饲养观察室里适应性饲养7d后,取10只作为正常对照组,喂以基础饲料,其余大鼠喂以高脂饲料,连续4周,禁食12h后ip给予STZ溶液30mg \cdot kg⁻¹,于1周后禁食12h,眼眶静脉丛取血分别测定FBG以及糖负荷(1g \cdot kg⁻¹)后2h的血糖值(2hBG),选择FBG正常且2hBG \geq 7.8mmol \cdot L⁻¹的大鼠确定为模型大鼠。取模型大鼠50只,随机分为5组,每组10只,分别为模型对照组、阳性对照罗格列酮组(1.0mg \cdot kg⁻¹),黄芪葛根汤高、中、低剂量组(8,4,2g \cdot kg⁻¹),继续喂以高脂饲料。正常对照组喂以基础饲料,连续给药8周后,大鼠取材处死(给药期间,灌胃以及多次乙醚麻醉眼眶取血,共计造成11只大鼠死亡,故最后每组有8只纳入统计数据)。

2.2 生化指标测定 大鼠禁食12h,用水合氯醛麻醉,腹主动脉取血酶法测定FBG,放免法测定空腹

胰岛素 (FINS), 并计算胰岛素敏感指数^[5] (ISI) = $\text{Ln} [1/(\text{Fins} \times \text{FBG})]$ 和 IR 指数^[6] (HOMA-IR) = $(\text{FBG} \times \text{Fins})/22.5$ 。

2.3 血浆 leptin 和 TNF- α 测定 大鼠禁食 12 h, 用水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 按照放免试剂盒要求进行操作, 应用 γ 计数器对样品进行计数, 测量各组大鼠血浆 leptin 及 TNF- α 浓度。

2.4 引物设计与合成 大鼠的 PPAR- γ mRNA 引物 (目的片段为 205 bp): 上游序列 5'-CTGGCCTCCCTGATGAATAA-3', 下游序列 5'-GGCGGTCTCCACTG AGAATA-3'; 内参选用 β -actin (目的片段为 600 bp): 上游序列 5'-GACCCAGATC ATGTTTGAGACC-3', 下游序列 5'-GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC-3'。引物均由广州生物合成公司合成。

2.5 RT-PCR 及结果半定量分析^[7] 大鼠全身麻醉后无 RNase 操作提取大鼠网膜处脂肪组织约 50 mg 液氮速冻保存备用。按 TRIzol 说明书提取总 RNA, 核酸测定仪测定总 RNA 浓度。以 1 g 总 RNA 为模板, 在 MMLV 逆转录酶作用下合成 cDNA。取 2 μL cDNA 在 Taq 酶作用下进行 PCR 反应, 反应体系 25 μL , 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 变性, 59 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s 延伸, 38 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。取 6 μL PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 应用 Image MasterTM Total La 图像分析系统分析各组待测基因与内参基因表达量的比值。

2.6 统计方法 所有数据均用 SPSS 13.0 统计软件进行统计, 两组间比较用方差分析 (One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对 ISI 及 HOMA-IR 的影响 模型组与正常对照组相比, 其 ISI 显著下降、HOMA-IR 显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 罗格列酮具有显著升高 ISI、降低 HOMA-IR 的作用 ($P < 0.01$), 黄芪葛根汤高、中剂量具有显著升高 T2DM 大鼠 ISI 和降低 HOMA-IR 的作用 ($P < 0.05$), 且呈一定剂量依赖性。表明黄芪葛根汤可改善 T2DM-IR 大鼠胰岛素敏感性, 见表 1。

3.2 对大鼠血浆 TNF- α 和 leptin 含量的影响 模型组大鼠血浆中 TNF- α 和 leptin 水平与正常对照组相比明显升高 ($P < 0.01$)。而黄芪葛根汤高、中剂量组均可显著降低大鼠的血浆中 TNF- α 和 leptin 水平 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 黄芪葛根汤对大鼠 ISI 及 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ISI	HOMA-IR
正常	-	-5.82 \pm 0.12	15.10 \pm 1.76
模型	-	-7.23 \pm 0.20 ¹⁾	62.40 \pm 12.35 ¹⁾
罗格列酮	0.001	-6.38 \pm 0.10 ³⁾	26.42 \pm 2.56 ³⁾
黄芪葛根汤	8	-6.93 \pm 0.20 ³⁾	36.69 \pm 3.17 ³⁾
	4	-6.89 \pm 0.15 ³⁾	43.99 \pm 5.81 ³⁾
	2	-7.18 \pm 0.25	60.33 \pm 15.85

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 黄芪葛根汤对大鼠 TNF- α 和

Leptin 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	leptin $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	1.45 \pm 0.12	0.33 \pm 0.08
模型	-	1.71 \pm 0.14 ¹⁾	1.134 \pm 0.39 ¹⁾
罗格列酮	0.001	1.41 \pm 0.105 ³⁾	0.50 \pm 0.17 ³⁾
黄芪葛根汤	8	1.45 \pm 0.18 ³⁾	0.60 \pm 0.18 ³⁾
	4	1.51 \pm 0.16 ²⁾	0.52 \pm 0.07 ³⁾
	2	1.63 \pm 0.19	1.03 \pm 0.28

3.3 对脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 表达的影响 半定量结果显示, 模型组大鼠脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 相对表达量明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。罗格列酮可显著增加脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 的相对表达 ($P < 0.01$), 黄芪葛根汤各剂量均可显著增加脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 的相对表达 ($P < 0.05$), 且呈一定剂量依赖性。表明黄芪葛根汤可显著增加 T2DM-IR 大鼠脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 的表达水平, 见表 3。

表 3 黄芪葛根汤对脂肪组织中 PPAR- γ mRNA

表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PPAR- γ/β -actin
正常	-	0.97 \pm 0.18
模型	-	0.58 \pm 0.12 ¹⁾
罗格列酮	0.001	1.03 \pm 0.22 ³⁾
黄芪葛根汤	8	0.88 \pm 0.12 ³⁾
	4	0.80 \pm 0.18 ²⁾
	2	0.80 \pm 0.14 ²⁾

4 讨论

研究发现, 脂肪组织不仅是能量储存器官, 还是一个可以分泌产生多种激素和细胞因子的新的内分泌器官^[8]。近年有报道胰岛素抵抗最早出现于脂肪组织^[9-10]。“脂肪组织毒性”的概念逐渐形成, 其内涵是指脂肪组织的量过多或过少, 分布异常, 脂肪因子分泌及功能异常, 将对全身的代谢产生危害。在 2010 年 3 月举行的第 14 届世界内分泌大会上, 有学者进一步提出“脂肪科学”的概念, 把脂肪组织

在全身代谢中的重要性提到一个更高的层次^[11-12]。

现已发现脂肪细胞分泌多种脂肪细胞因子及蛋白质因子。其中已广为人知的有 leptin, 脂联素, TNF- α , 白介素-6, FFA 等能通过内分泌、旁分泌和自分泌等途径,参与调节胰岛素在靶组织的生物效应,可能在 IR 中起着非常重要的作用^[13]。TNF- α 是一种具有多功能的炎性细胞因子,与胰岛素水平、葡萄糖代谢及脂代谢密切相关,肥胖个体的脂肪组织存在着 TNF- α 的过度表达,释放入血后作用于外周靶组织及肝脏,诱导 IR 的发生。leptin 是肥胖基因的产物,是脂肪细胞分泌的释放入血的一种激素。研究表明,瘦素与胰岛素之间有双向调节作用^[14]。在病理状态下,瘦素受体表达下降,减弱了对胰岛素分泌的抑制作用,破坏脂肪-胰岛轴反馈机制,出现高胰岛素血循环中高瘦素水平,但效应减低,形成所谓的瘦素抵抗^[15]。脂肪组织中瘦素抵抗导致脂肪增加,肝脏、骨骼肌组织中 TG 增加,糖耐量减低及高胰岛素血症。

PPARs 是核激素受体配体激活的转录因子的超家族。其中 PPAR- γ 主要富含于脂肪组织,并对维持人类胰岛素敏感性,葡萄糖稳态是不可缺少的。当 PPAR- γ 基因突变或受其他因素抑制时,可致 IR。此外有研究显示,PPAR- γ 的配体不仅能增强胰岛素介导的葡萄糖摄取和减轻炎症反应,同时能逆转 IR 的主要缺陷,抑制动脉粥样硬化的发生及改善内皮功能。TZD 类化合物是胰岛素增敏剂,同时也是 PPAR- γ 的药理性配体,与 PPAR- γ 结合而发挥降低血糖及增加胰岛素敏感性的作用。因此,PPAR- γ 的配体可能在阻止 IR 进程方面发挥了不容忽视的作用^[16]。

本研究结果表明,黄芪葛根汤可显著提高 T2DM 大鼠 ISI,降低 HOMA-IR,同时显著降低血浆中 TNF- α 和 leptin 水平,增加脂肪组织中 PPAR- γ mRNA 的表达水平,增加组织对胰岛素的敏感性,有效减轻 IR 程度。鉴于上述及前期的研究成果,我们推测黄芪葛根汤可能通过或至少部分通过影响脂肪组织,包括脂肪组织生成与分化、脂肪因子的分泌与功能、不同部位脂肪组织的功能等,促进胰岛素信号转导,从而发挥改善胰岛素抵抗的作用,但其具体机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shulman G I. Cellular mechanisms of insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2000,106:171.
- [2] 王春怡,陈艳芬,李卫民,等. 黄芪葛根汤对实验性糖

尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):124.

- [3] 郝玉美,刘洪琪. 苦瓜、黄芪、黄芩苷对2型糖尿病大鼠模型胰岛素抵抗的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2007,9(5):6.
- [4] 李勇,刘孟宇,王颜刚. 生芪降糖颗粒对胰岛素抵抗鼠的作用及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(5):449.
- [5] 李秀钧. 胰岛素抵抗综合征:胰岛素敏感性评估及应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:44.
- [6] Hanley A J, Williams K, Gonzalez C, et al. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance; combined results from the san antonio heart study, the mexico city diabetes study, and the insulin resistance atherosclerosis study [J]. Diabetes, 2003, 52:463.
- [7] 王开成,方朝晖,王佑民,等. 罗格列酮提高胰岛素抵抗大鼠大网膜脂肪细胞 PPAR- γ mRNA 的表达水平[J]. 江西医药,2006,41(11):847.
- [8] 李秀钧. 脂肪组织是又一个新的内分泌器官[J]. 国外医学:内分泌学分册,2002, 22(3):129.
- [9] Cahova' M, Vavřínkova' H, Kazdova' L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance[J]. Physiol Res,2007, 56:1.
- [10] Kim J Y, Van de Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue[J]. J Clin Invest, 2007, 117:2621.
- [11] Eldor R, Raz I. Lipotoxicity versus adipotoxicity—the deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 74s:s3.
- [12] Nakao K. Adiposcience and adipotoxicity[J]. Nat Clin Pract Endoc Metab, 2009, 5(2):63.
- [13] Kershaw E E, Fliter J S. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. J Clin Endocrinol Metab,2004,89(6):2548.
- [14] Kolaczynski J W, Nyce M R, Considine R V, et al. Acute and insulin on leptin production in humans: studies *in vivo* and chronic effects of *in vitro*[J]. Diabetes, 1996, 45:699.
- [15] Scarpace P J, Matheny M, Tumer N. Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats [J]. Neuroscience, 2001,104(4):1111.
- [16] Hsueh W A, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol,2002,92(4A):3J.

[责任编辑 聂淑琴]