

丹蛭降糖胶囊对糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌葡萄糖转运体 IV 基因表达的影响

方朝晖^{1*}, 鲍陶陶¹, 王开成¹, 王佑民²

(1. 安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230030)

[摘要] 目的: 观察丹蛭降糖胶囊对糖尿病胰岛素抵抗模型大鼠骨骼肌葡萄糖转运体 IV (GLUT4) 基因表达的影响, 以初步明确其作用靶点。方法: 雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、中药低剂量组、中药高剂量组、西药组、中西药合用组。空白组喂以普通饲料, 模型组与各治疗组注射小剂量链脲佐菌素并喂以高热量饲料, 常规测定各组大鼠治疗前后的体重、空腹血糖和治疗后各组大鼠的空腹血脂、血清胰岛素水平, 计算胰岛素敏感性指数, 用 Northern 印迹和杂交法测定骨骼肌 GLUT4 基因的表达。结果: 丹蛭降糖胶囊能有效地减轻模型大鼠体重, 能明显降低大鼠的空腹血糖和胰岛素水平, 改善脂代谢紊乱状况, 能增加胰岛素抵抗 (IR) 大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 的表达, 从而改善了外周组织的胰岛素敏感性。结论: 丹蛭降糖胶囊对 2 型糖尿病大鼠 IR 有显著的改善作用, 提示其机制可能与增加 IR 大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 的表达有关。

[关键词] 胰岛素抵抗; 骨骼肌; 葡萄糖转运体 IV; 丹蛭降糖胶囊

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)06-0032-04

The Effect of DZJT-Capsule on the GLUT4 Gene Expression in Skeletal Muscle of Diabetic Rat

FANG Zhao-hui¹, BAO Tao-tao¹, WANG Kai-cheng¹, WANG You-min²

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical College, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate Danzhi Jiangtang Capsule's effect on the GLUT4 gene expression in skeletal muscle of diabetic IR rat and to find out its functional target. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into six groups (normal group, model group, Rosiglitazone Maleate Tablets treating group, Rosiglitazone Maleate Tablets and high dose of Danzhi Jiangtang Capsule treating group, low dose of Danzhi Jiangtang Capsule treating group, high dose of Danzhi Jiangtang Capsule treating group). The rats of normal group were fed with common food while the others with high calorie food and injected with low dose of STZ. The body weigh, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FIns), blood fat of all rats were measured. Insulin sensitivity index (ISI) was calculated accordingly, and the expression of GLUT4 gene in skeletal muscle of diabetic IR rat was also measured. **Results:** Danzhi Jiangtang Capsule could reduce body weight, FBG level and FIns level, and improve blood fat condition. Danzhi Jiangtang Capsule could increase the expression of GLUT4 gene in skeletal muscle of diabetic IR rat, thereby it improved insulin sensitivity of peripheral tissue. **Conclusions:** Danzhi Jiangtang Capsule can ameliorate diabetic IR condition of the model rats and its mechanism is probably related to its effect of enhancing the genic expressional level of GLUT4.

[Key words] insulin resistance; skeletal muscle; GLUT4; Danzhi Jiangtang Capsule

[收稿日期] 2005-09-02

[基金项目] 国家中医药管理局科研课题 (NO: DIX025A)

[通讯作者] 方朝晖, Tel: (0551) 3998047; E-mail: fangzhaohui@medmail.com.cn

胰岛素抵抗(IR) 是指外周靶组织对内外源性胰岛素(Ins) 的敏感性和反应性降低, 是 2 型糖尿病(T2DM) 中普遍存在的现象。胰岛素抵抗的原因之一是骨骼肌及脂肪组织中胰岛素反应性葡萄糖转运体 IV(GLUT4) 的含量及活性降低^[1]。血糖变化参与调节糖尿病大鼠骨骼肌中 GLUT4 的基因表达。本实验采用制作糖尿病胰岛素抵抗的大鼠实验模型, 观察中药制剂丹蛭降糖胶囊对糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌中 GLUT4 基因表达的影响, 探讨中药改善糖尿病胰岛素抵抗的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料 正常 Wistar 雄性大鼠 79 只, 体重(200 ± 20) g, 由河南医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号为 3212。基础饲料: 蛋白质占 23%, 碳水化合物占 53%, 脂肪占 5%; 购自安徽医科大学动物房。高热量饲料由基础饲料加猪油、麻油、鸡蛋和花生等混合而成(在 10000g 基础饲料中加入食盐 150g、白糖 50g、猪油 2000g、麻油 400g、花生 2000g、鸡蛋 900g。碳水化合物 48%, 脂肪 22%, 蛋白质 20%) 自行配置。丹蛭降糖胶囊(太子参 1000g, 地黄 800g, 牡丹皮 800g, 泽泻 600g, 菟丝子 400g, 水蛭 100g) 为安徽中医学院第一附属医院内制剂, 由药物制剂中心生产(批号为: 030125), 每粒胶囊含生药 0.5g。马来酸罗格列酮片, 由葛兰素史克(天津) 有限公司生产(批号为: 03110001), 规格为 4mg/片。链脲佐菌素, 美国 sigma 公司产品, 由北京夏斯生物技术有限公司提供。¹²⁵I 胰岛素放射免疫试剂盒, 为中国原子能科学研究院同位素研究所产品。引物由广州瑞真生物技术有限公司合成。TGL-168 离心机, 上海安亭科学仪器厂产品; 日立-7060 全自动生化分析仪, 上海长征医学科技有限公司产品; T-Gradient PCR 仪, 德国 Whatman 公司生产; 凝胶成像系统, 珠海黑马医学仪器有限公司生产; UV-754 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂生产; DYY-10 型(ECP3000) 三恒电泳仪, 北京六一仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立^[2] 18 月龄 Wistar 雄性大鼠造模前先用基础饲料适应性饲养一周。明暗周期 12/12h, 自由摄食、饮水, 空白组 9 只继续喂以基础饲料至实验结束。模型组及治疗组喂以高热量饲料, 共计四周。然后按 25mg/kg 体重的剂量一次性腹腔内注射 STZ(溶于 0.1mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH4.4)。

造模成功的标准为: 于 72h 后禁食 12h 按 2g/kg 体重灌喂 20% D-葡萄糖溶液, 做口服糖耐量实验, 0 和 120min 血糖分别大于 7.0mmol/L 和 11.1mmol/L。选择造模成功的 IR 大鼠 50 只, 分为模型组及治疗组, 继续喂以高热量饲料至实验结束, 治疗组同时灌胃给药, 空白组与模型组灌服生理盐水。

1.2.2 分组与给药 分 6 组: 空白组、模型组、治疗组(马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊高剂量+ 马来酸罗格列酮组、丹蛭降糖胶囊低剂量组、丹蛭降糖胶囊高剂量组), 每组 10 只大鼠。(其中治疗过程中死亡 5 只, 故最后每组有 9 只纳入统计数据。) 西药对照组灌胃给予罗格列酮生理盐水液 0.8mg/kg(相当于临床成人用量的 6 倍); 丹蛭降糖胶囊高剂量组给予丹蛭降糖胶囊生理盐水液 1080mg/kg(相当于临床成人用量的 12 倍); 丹蛭降糖胶囊低剂量组给予丹蛭降糖胶囊生理盐水液 540mg/kg(相当于临床成人用量的 6 倍), 中西药对照组给予丹蛭降糖胶囊生理盐水液 1080mg/kg 合并罗格列酮生理盐水液 0.8mg/kg, 正常对照组及模型对照组灌服相同容量的生理盐水。所有动物均于上午一次灌服, 持续治疗 4 周。除正常对照组喂以普通饲料外, 其余各组均隔日喂以高热量饲料, 持续 4 周。室温保持在 20℃左右, 试验期间所有动物限食不限水。

1.2.3 标本的采集和制备 末次给药后禁食 12h 测体重, 以 0.8% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 于腹主动脉抽血, 按照指标以及试剂盒的要求分别留取血浆和血清。并取各大鼠的右后肢股四头肌保存备用。

1.2.4 指标检测 血糖(GLU) 的测定, 采用美国强生公司生产的 One-Touch 血糖仪测定实验大鼠治疗前后的血糖。血甘油三酯(TG) 和胆固醇(TC), 采用比色法, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。血胰岛素(Ins), 采用放射免疫分析, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。胰岛素敏感指数(ISI), 采用李光伟^[3]计算方法以空腹血糖与空腹胰岛素乘积倒数的自然对数来表示, 即 $ISI = \ln 1 / (\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})$ 。骨骼肌 GLUT4 基因表达的测定^[1]: (1) 组织总 RNA 的提取 采用一步快速酚法抽提股四头肌总 RNA, DEPC 处理过的三蒸水溶解, 测定 OD230、OD260、OD280 值以估计纯度, 要求 OD260/OD280 值在 1.7~ 2.0 之间, 样本分装于微量离心管中, - 70℃冰箱保存。(2) GLUT4, cDNA 探针的制备 采

用氯化钙法转化程序,将含有 GLUT4 cDNA 重组质粒转化至 XL1-Blue 大肠杆菌扩增,改良碱裂解法回收质粒 DNA。ECoRI 酶切后低熔点琼脂糖凝胶电泳回收探针。参照随机引物标记试剂盒使用说明,用 [α -³²P] dCTP 标记 cDNA 探针, TCA 沉淀法测定探针合成量及比放射性,要求比放度 > 10⁹ 计数·分⁻¹/μg。(3) Northern 印迹和杂交 取 30μg 总 RNA 样品(4.5μL 体积)变性后点样于甲醛凝胶中电泳 5h,再利用细管洗脱法将变性的 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜上进行杂交 16h,杂交后滤膜与 X 线片置片夹放射自显影 4 天,显影片上分子杂交曝光斑点用 UpvectorsPC 微机图像处理系统进行光密度扫描,求出曝光斑点的光密度值和面积,用两者乘积的平均值代表 GluT4mRNA 的含量,以正常组的值计为 100,其余之组体相对计数。

1.2.5 统计学分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 丹蛭降糖胶囊对大鼠体重的影响 由表 1 可见,造模后,与空白组相比模型组及各给药组大鼠体重明显增加($P < 0.01$),而治疗后,各用药组与模型组比较,体重明显减轻($P < 0.01$)。

2.2 丹蛭降糖胶囊对大鼠血糖、血脂的影响 由表 2 可见,治疗后,除中药低剂量组外其余各用药组空

腹血糖明显降低($P < 0.01 \sim 0.05$)。由表 3 可知,经治疗后各给药组与模型组比较, TG 均有不同程度降

表 1 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	灌胃给药剂量 (mg/kg)	体重(g)	
		造模后	治疗 4 周后
空白组	—	342.1 ± 19.1	382.5 ± 32.1
模型组	—	381.0 ± 20.9 ²⁾	435.8 ± 34.6 ²⁾
丹蛭降糖胶囊高剂量组	1080	374.6 ± 20.7 ²⁾	391.2 ± 21.1 ⁴⁾
丹蛭降糖胶囊低剂量组	540	378.9 ± 25.9 ²⁾	395.6 ± 23.9 ⁴⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	384.9 ± 23.9 ²⁾	400.9 ± 26.2 ³⁾
中西药合用组	丹蛭降糖 1080 罗格列酮 0.8	383.8 ± 26.1 ²⁾	393.5 ± 23.1 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)。

表 2 造模后和治疗后各组动物空腹血糖的比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	灌胃给药剂量 (mg/kg)	FBG(mmol/L)	
		造模后	治疗 4 周后
空白组	—	5.41 ± 1.31	5.68 ± 1.61
模型组	—	9.23 ± 1.57 ²⁾	9.33 ± 1.89 ²⁾
丹蛭降糖胶囊高剂量组	1080	8.79 ± 1.51 ²⁾	6.91 ± 1.52 ⁴⁾
丹蛭降糖胶囊低剂量组	540	8.61 ± 1.45 ²⁾	7.89 ± 2.48 ¹⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	9.33 ± 1.15 ²⁾	6.66 ± 1.95 ⁴⁾
中西药合用组	丹蛭降糖 1080 罗格列酮 0.8	9.26 ± 1.65 ²⁾	7.41 ± 1.71 ³⁾

表 3 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	灌胃给药剂量(mg/kg)	TC(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)
空白组	—	0.43 ± 0.13	1.69 ± 0.28	1.51 ± 0.26
模型组	—	1.86 ± 0.39 ²⁾	2.19 ± 0.25 ²⁾	1.02 ± 0.14 ²⁾
丹蛭降糖胶囊高剂量组	1080	0.62 ± 0.19 ⁴⁾	1.79 ± 0.29 ⁴⁾	1.38 ± 0.09 ⁴⁾
丹蛭降糖胶囊低剂量组	540	1.35 ± 0.37 ^{2,4)}	1.89 ± 0.41	1.31 ± 0.11 ⁴⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	0.96 ± 0.34 ^{2,4)}	2.03 ± 0.27 ²⁾	1.29 ± 0.11 ^{1,4)}
中西药合用组	丹蛭降糖胶囊 1080 马来酸罗格列酮 0.8	0.80 ± 0.26 ^{2,4)}	1.96 ± 0.29	1.38 ± 0.16 ⁴⁾

表 4 各组大鼠血清胰岛素、胰岛素敏感性指数及血清 C 肽的比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	灌胃给药剂量 (mg/kg)	FIns(mU/L)	ISI	C-P(ng/dL)
空白组	—	24.97 ± 5.61	- 5.10 ± 0.22	0.20 ± 0.07
模型组	—	43.86 ± 9.68 ²⁾	- 5.96 ± 0.15 ²⁾	0.40 ± 0.14 ²⁾
丹蛭降糖胶囊高剂量组	1080	25.79 ± 12.13 ⁴⁾	- 5.23 ± 0.19 ⁴⁾	0.24 ± 0.08 ⁴⁾
丹蛭降糖胶囊低剂量组	540	29.88 ± 9.09 ⁴⁾	- 5.33 ± 0.39 ³⁾	0.21 ± 0.08 ⁴⁾
马来酸罗格列酮组	0.8	28.10 ± 7.65 ⁴⁾	- 5.19 ± 0.26 ⁴⁾	0.16 ± 0.07 ⁴⁾
中西药合用组	丹蛭降糖胶囊 1080 马来酸罗格列酮 0.8	29.87 ± 7.26 ⁴⁾	- 5.29 ± 0.38 ⁴⁾	0.26 ± 0.10 ³⁾

低($P < 0.01 \sim 0.05$), HDL-C 均显著升高($P < 0.01$)。

2.3 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠血清胰岛素、C 肽水平及胰岛素敏感指数的影响 由表 4 可知, 治疗后与模型组比较, 各给药组 Fins、C-P 及 ISI 均有明显差异($P < 0.01 \sim 0.05$)。

2.4 丹蛭降糖胶囊对大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 含量变化 见表 5。

表 5 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 含量变化($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 (mg/kg)	暴光强度	GLUT4 mRNA 相对量
空白组	—	1936.72 ± 238.6	100
模型组	—	826.52 ± 203.3 ²⁾	47.8
丹蛭降糖胶囊	1080	1253.9 ± 168.4 ²⁾⁴⁾	93.7
丹蛭降糖胶囊	540	1127.3 ± 215.1 ²⁾³⁾	89.7
马来酸罗格列酮组	0.8	1426.8 ± 217.3 ²⁾⁴⁾	91.2
中西药合用组	丹蛭降糖 1080 罗格列酮 0.8	1715.6 ± 219.7 ¹⁾⁴⁾	95.6

3 讨论

2 型糖尿病具有复杂的病理生理学基础, 并非由单一的病理生理机制所致, 2 型糖尿病普遍存在 IR。IR 是 2 型糖尿病的一个特征性改变, 且 IR 可先于 2 型糖尿病多年而存在。李光伟等根据(OGTT) 人群普查结果认为, 即使血糖完全正常 β 细胞功能无损害的人群, IR 本身就可致正常糖耐量(NGT) 人群的糖耐量恶化, 从而表明 IR 是 2 型糖尿病的始动因素^[3]。IR 使糖耐量正常的人发生 β 细胞功能损害而变为糖耐量低减(IGT), β 细胞进一步衰竭而致发生糖尿病。目前一般认为 IR 和胰岛素分泌缺陷是 2 型糖尿病发病的基础。只要胰岛 β 细胞能够代偿 IR, 血糖浓度仍可维持正常。但当机体不能代偿由 IR 造成的血糖升高时, 血糖水平持续高出正常范围, 最终导致 2 型糖尿病的发生。因此 IR 是贯穿整个 2 型糖尿病发生、发展过程中的重要因素。

研究表明, 糖尿病状态下外周组织对胰岛素产生抵抗的环节之一是由 GLUT4 含量减少所致的受

体后缺陷造成的, 这种变化产生的原因很可能是高血糖抑制了 GLUT4 基因的表达, 高血糖改善后, 基因表达也会增加^[1]。

本实验研究结果显示, 糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 的含量低于正常大鼠, 是因为胰岛素的敏感性下降导致了大鼠体内的胰岛素相对不足引起骨骼肌细胞内 GLUT4 mRNA 含量减少。经丹蛭降糖胶囊治疗后糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌中 GLUT4 mRNA 增加, 故改善了外周组织的胰岛素敏感性, 丹蛭降糖胶囊除了改变实验动物的血糖、血脂水平外, 还可减轻大鼠的体重, 其作用是一综合的多靶点效应。

丹蛭降糖胶囊是在大量古今文献调查和既往中医证候学调查和预试验的基础上, 认为气虚、阴亏、血瘀为 2 型糖尿病的基本病机^[4,5], 并以此为理论依据, 参照中医文献和中药药理的部分最新研究成果, 选择具有“益气、养阴、活血”功效的中药组方, 筛选出太子参、丹皮、生地黄、泽泻、菟丝子、水蛭组成的复方制剂。方中太子参补益脾肾之气, 生地黄滋养脾肾之阴, 菟丝子补肾固精; 丹皮、水蛭行气活血, 化瘀通络, 使肾络通畅; 泽泻清热泻痰浊。全方阴阳互济, 补通兼施, 寒温并调, 补不碍邪, 攻不伤正, 共奏益气养阴, 活血化痰之功。

[参考文献]

- [1] 李益明, 方京冲, 杨秀芳, 等. 血糖变化对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 基因表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(3): 164-166.
- [2] 司晓晨, 尚文斌, 卞慧敏, 等. 链脲佐菌素加高脂膳食诱导 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 安徽中医临床杂志 2003, 15(5): 383-385.
- [3] 李光伟, 潘孝仁. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656.
- [4] 方朝晖, 张念志, 韩明向. 益气养阴活血法对 II 型糖尿病患者免疫功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(11): 47-78.
- [5] 方朝晖, 章小平. 中医药改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究思路与方法[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 71-72.