

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

沈洁¹, 周珊珊², 万晓刚^{1*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;

2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 观察黄连对 2 型糖尿病大鼠的炎症因子、血糖、内质网应激信号通路蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)/活化转录因子 4 (ATF4)/CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 相关蛋白的干预作用。**方法:** 将 80 只雄性 SPF 级大鼠随机分为正常组、模型组、盐酸二甲双胍组、黄连组, 每组 20 只。采用“10 周高糖高脂饲料喂养 + 经腹腔注入低剂量链脲佐菌素 (STZ)”方案对非正常组大鼠造模。盐酸二甲双胍组予盐酸二甲双胍 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 黄连组按照剂量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 模型组、正常组大鼠均给予同等体积的蒸馏水, 每天 1 次。待灌胃期终止, 取血, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测各组大鼠的空腹血糖 (FBG), C 反应蛋白 (CRP), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平; 采用免疫组化法检测各组大鼠胰腺组织葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78), CHOP, ATF4 蛋白的表达; 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠胰腺组织 PERK, 磷酸化 (p)-PERK 蛋白的表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG, TNF- α , CRP 水平及 ATF4, CHOP, GRP78, p-PERK 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连组和盐酸二甲双胍组 FBG, TNF- α , CRP 水平, ATF4, CHOP, GRP78, p-PERK 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$)。**结论:** 黄连能在一定程度上降低大鼠血糖, 缓解炎症反应, 可抑制质网应激 PERK/ATF4/CHOP 信号通道, 减少 CHOP, ATF4, GRP78, p-PERK 的表达。

[关键词] 黄连; 2 型糖尿病; 内质网应激; 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0050-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191641

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.1413.028.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 10:29

Effect of Coptidis Rhizoma on Endoplasmic Reticulum Stress Pathway PERK/ATF4/CHOP in Pancreas of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

SHEN Jie¹, ZHOU Shan-shan², WAN Xiao-gang^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Coptidis Rhizoma on blood sugar, inflammatory factors and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) /activating transcription factor 4 (ATF4) /CCAAT/enhance-binding protein homologous protein (CHOP) pathway in type 2 diabetic mellitus rats. **Method:** The 80 SPF grade male rats were randomly divided into normal group, model group, metformin hydrochloride group, Coptidis Rhizoma group, with 20 rats in each group. The rats in the abnormal group were given "10-week high-sugar and high-fat diet + intraperitoneal injection of low dose streptozotocin (STZ)" regimen. Metformin hydrochloride group was given $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, while rhizoma coptidis group was given $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Both

[收稿日期] 20190221(009)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2015A020210092)

[第一作者] 沈洁, 在读硕士, 从事经方治疗内分泌及代谢性疾病研究, E-mail: 973259261@qq.com

[通信作者] * 万晓刚, 教授, 主任医师, 从事经方治疗内分泌及代谢性疾病研究, E-mail: 2345606@sina.com

model group and normal group were given the same amount of distilled water once a day. Fasting blood glucose (FBG), C reactive protein (CRP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) at an acute stage after 5-week intervention were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) methods. Immunohistochemistry method was performed with proteins glucoseregulated protein 78 (GRP78), ATF4, CHOP. Western blot assay was used to detect PERK, phosphorylated PKR like endoplasmic reticulum regulating kinase (p-PERK). **Result:** Compared with normal group, the FBG, CRP, TNF- α , p-PERK, GRP78, ATF4 and CHOP of model group improved ($P < 0.05$). The *Coptidis Rhizoma* group and positive control group could lower serum FBG, CRP, TNF- α , p-PERK, GRP78, ATF4, CHOP in contrast with model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Coptidis Rhizoma* can reduce blood sugar and reduce the levels of inflammatory factors, inhibit plasmic reticulum stress PERK/ATF4/CHOP pathway, and reduce CHOP, ATF4, GRP78, p-PERK expression in rats.

[**Key words**] *Coptidis Rhizoma*; type 2 diabetes mellitus; endoplasmic reticulum stress; inflammatory factors

糖尿病在我国属高发慢性疾病,其中 2 型糖尿病(T2DM)发病率更高。临床上糖尿病以降糖西药和相关并发症治疗药物为主,但是弊端较多,多数患者需长期甚至终身服药,而降糖西药往往有低血糖、水肿、乳酸酸中毒、胃肠道不适等不良反应^[1]。中药在控制病情、降糖与抑制糖尿病并发症发生方面疗效确切,且副作用相对较小^[2-3]。糖尿病属中医“消渴”范畴,最早在《名医别录》中记载黄连可用于治疗消渴病^[4]。现代药理学研究发现,黄连具有降血糖、抗菌、消炎、调血脂等药理活性,也因其显著的降糖活性较早就用于糖尿病的治疗^[5]。

罗婷婷等^[6]通过网络分析药理学方法,发现中药黄连是通过多成分、多靶点、多通路对 T2DM 达到干预作用结果。在胰岛素抵抗形成, T2DM 发病方面,内质网应激(ERS)发挥着关键性影响^[7-11]。ERS 存在 3 条凋亡通道,分别为蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK),活化转录因子 4(ATF4),肌醇依赖酶 1(IRE1)诱导的 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP),半胱氨酸蛋白酶-12(Caspase-12),c-Jun 氨基末端激酶(JNK)凋亡通道。近年来,研究发现黄连单煎剂可抑制 JNK 通路的激活^[11]。黄连的有效成分小檗碱可使肝脏组织的应激标志物真核翻译起始因子 2 α 亚单位(eIF2 α),PERK 及其磷酸化水平下调^[12]。大量的实验研究和临床经验,提示黄连可通过干预内质网应激信号通路来改善内质网应激状态。在诱导细胞凋亡方面当前研究提出 PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP 为最重要的通路^[13],但黄连是否可以调节 PERK/ATF4/CHOP 信号通路,尚未明确。因此,本实验拟采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注入低剂量链脲佐菌素(STZ)的方式制备 T2DM 大鼠模型,观察黄连对 T2DM 大鼠血糖、炎症因子和

胰岛素抵抗的作用,阐明其对糖尿病的作用及药理机制,为明确药物的作用靶点提供药理学依据,为临床更好的运用该中药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物 80 只 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠,体质量(140 \pm 20) g,购于湖北省疾控中心,合格证号 SCXK(鄂)2015-0018。饲养于湖北中医药大学 SPF 级动物实验室内,室温(25 \pm 3) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 \pm 5) $^{\circ}$ C,12 h 明暗光照周期,自由进食饮水。本实验获得湖北中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药物和试剂 黄连购自广州中医药大学中药房,产地四川省,批号 160201,由广州中医药大学第一附属医院主管中药师谭苑芬鉴定为正品。称取黄连 2 kg,由 8 倍蒸馏水对其进行 60 min 浸泡,煎煮 3 次,混匀后低温浓缩为浸膏,再冷冻干燥为粉末,密封干粉,4 $^{\circ}$ C 保存备用;盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 H20023370);STZ(美国 Sigma 公司,批号 119K1591);C 反应蛋白(CRP)试剂盒(北京利德曼生化股份有限公司,批号 L150309274);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 EELR0019c);4% 多聚甲醛,苏木素染色液 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(武汉阿斯本生物技术有限公司,批号分别为 AS1018, AS1055A, AS1086);牛血清白蛋白(BSA)(上海罗氏制药有限公司,批号为 10735078001);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9033);PERK 抗体,磷酸化(p-)PERK 抗体,CHOP 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 3192, 3179, 2895); β -肌动蛋白(β -actin)(北京天德悦生物科技有限责任公司,批号 TDY051);ATF4, GRP78

抗体(上海艾博抗贸易有限公司,批号分别为 ab184909,ab108615);辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗山羊、山羊抗大鼠二抗(南非爱施健公司,批号分别为 AS-1108,AS-1093)。

1.3 仪器 JPS-5 型血糖仪, JPS-5 型血糖试纸(北京怡成生物电子技术股份有限公司);DR-200Bs 型酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);TGL-16c 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TGL-16c 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器);HH-W-600 型水浴锅(金坛市江南仪器厂);JT-12K 型脱水机, JB-P5 型包埋机, JB-L5 型冻台, JK-5 型组织摊片机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型切片机(上海徠卡仪器有限公司);DHG-9123A 型烘箱(上海一恒科学仪器有限公司);HH-W-600 型水浴锅(金坛市江南仪器厂);TYXH-II 型涡旋混合器(广州市天悦电子有限公司);KE0003087/KA0056573 型移液枪(上海 Dragon 公司);GT1001 型组化笔(美国 Gene tech 公司);CX-21 型普通光学显微镜(深圳奥林巴斯工业有限公司);IX51 型倒置显微镜(深圳奥林巴斯工业有限公司);MicroPublisher 型成像系统(美国 Qimaging 公司);WO-99405A 型脱色摇床, DYY-6C 型电泳仪, DYCZ-40D 型转移电泳槽, DYCZ-24DN 型垂直电泳槽(北京六一仪器厂);AX-II 型暗匣(广东粤华医疗器械厂);LiDE110 型扫描仪(中国佳能有限公司)。

1.4 造模、分组及给药 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为 2 组,分别为正常组(20 只),造模组(60 只),正常组予普通饲料喂养 10 周。造模组予高脂高糖饲料喂养 10 周后,禁食不禁水 12 h,给予大鼠腹腔注射 STZ($0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。造模 5 d 后尾静脉采血测空腹血糖,重复测定 3 次 $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠为糖尿病大鼠^[14]。按血糖值随机分为 3 组,分别为模型组、盐酸二甲双胍组、黄连组。分组后次日起所有大鼠称体质量后给药,黄连组采取灌胃处理,800 g 黄连得黄连粉 187.5 g,1 g 黄连可提取 0.23 g 黄连粉,按人与大鼠体表面积比换算给药等效剂量,黄连组灌胃剂量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;盐酸二甲双胍组采取盐酸二甲双胍处理,剂量为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药^[15];模型组与正常组大鼠给予等体积蒸馏水灌胃,每天灌胃 1 次,连续灌胃 5 周。干预期间均采用普通饲料喂养,自由进食饮水。

1.5 标本采集 首次给药前空腹 12 h,尾静脉采血测 FBG。灌胃 5 周后,空腹 12 h,待成功麻醉,2%戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉采血制备血清标本,静

置 2 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,所得血清冻存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。将大鼠仰卧固定,沿腹中线剪开,摘取各组大鼠胰腺。

1.6 ELISA 检测大鼠血清中炎症因子 TNF- α , CRP 水平 实验操作均严格按试剂盒说明书上操作,记录数据,进行分析。取出酶标板,依照次序对应分别加入标准品 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 于空白微孔中;分别标记样品编号,加入样品 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 于空白微孔中;在对照品孔和样品孔中加入酶标记溶 $50 \text{ }\mu\text{L}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育反应 60 min;洗板机清洗 5 次,每次静置 10 ~ 20 s;每孔加入底物 A, B 液各 $50 \text{ }\mu\text{L}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 min;每孔加入终止液 $50 \text{ }\mu\text{L}$,终止反应。在 15 min 内在 450 nm 处测定各孔的吸光度 A 。制作标准曲线,计算各样本浓度。

1.7 免疫组化检测大鼠胰腺 GRP78, ATF4, CHOP 蛋白的表达 组织切片进行脱蜡至水,切片置于 EDTA 缓冲液中微波修复,室温下置于 3% 过氧化氢溶液避光孵育。5% BSA 封闭 20 min。一抗 $50 \text{ }\mu\text{L}$ (CHOP 1 : 500, ATF4 1 : 50, GRP78 1 : 300) 覆盖组织, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。50 ~ 100 μL 相应种属的二抗 (1 : 200), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min。新鲜配制 DAB 溶液 50 ~ 100 μL 显色,苏木素复染,1% 盐酸酒精分化 (约 1 s),自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗。梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。待完成采图,采用 Image-Pro Plus 对积分吸光度 IA 进行测定。

1.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测胰腺 PERK, p-PERK 蛋白的表达 提取胰腺组织蛋白,包括贴壁细胞总蛋白、悬浮细胞总蛋白、胞浆胞核蛋白,针对样品蛋白浓度,通过 BSA 蛋白定量试剂盒对各组蛋白量进行测定;取含总蛋白上样量为 40 μg 的样品进行 SDS-PAGE 电泳,封闭 1 h。按抗体说明书加入 PERK 一抗 (1 : 2 000), p-PERK 一抗 (1 : 2 000), β -actin (1 : 1 万) 置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,洗膜,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1 : 1 万)。采用化学发光法 (ECL) 显像曝光,采用 AlphaEaseFC 软件对胶片进行处理,进而确定目标带光密度值。

1.9 统计学方法 数据处理由软件 SPSS 22.0 完成,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对计量资料进行正态检验,如分布符合正态检验者,采用单因素方差法展开多组间对比分析,若不符合正态分布,采用非参数秩和检验进行多组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 T2DM 大鼠体质量、血糖的影响 治疗干预

前各组大鼠体质量均显著低于正常组 ($P < 0.05$), 糖尿病各组血糖均显著高于正常组 ($P < 0.05$); 治疗干预后, 与正常组比较, 模型组大鼠体质量显著下

降 ($P < 0.05$), 血糖明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连组、盐酸二甲双胍组大鼠血糖明显下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 黄连对 2 型糖尿病大鼠体质量、血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effect of Coptidis Rhizoma on body weight and blood glucose in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	治疗前		治疗后	
		体质量/g	血糖/ $mmol \cdot L^{-1}$	体质量/g	血糖/ $mmol \cdot L^{-1}$
正常	-	491.05 ± 40.18	5.75 ± 0.42	568.10 ± 41.80	6.91 ± 0.28
模型	-	370.50 ± 36.19 ¹⁾	20.51 ± 2.76 ¹⁾	261.50 ± 40.46 ¹⁾	24.87 ± 3.86 ¹⁾
黄连	0.4	366.72 ± 29.96 ²⁾	20.69 ± 3.10 ²⁾	277.47 ± 60.87 ²⁾	17.31 ± 6.32 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.2	361.50 ± 31.11 ²⁾	20.78 ± 3.00 ²⁾	241.56 ± 39.08 ²⁾	18.09 ± 3.97 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

2.2 对 T2DM 大鼠血清中 CRP, TNF- α 水平的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α , CRP 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连组与盐酸二甲双胍组大鼠血清 TNF- α , CRP 水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 黄连对 2 型糖尿病大鼠 CRP, TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of Coptidis Rhizoma on levels of CRP and TNF- α in T2DM diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

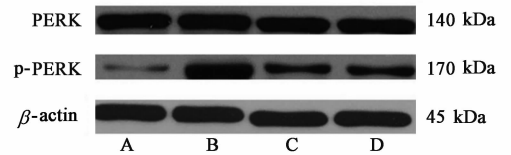
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CRP/ $mg \cdot L^{-1}$	TNF- α / $ng \cdot L^{-1}$
正常	-	1.06 ± 0.09	83.22 ± 8.07
模型	-	2.89 ± 0.11 ¹⁾	154.89 ± 7.34 ¹⁾
黄连	0.4	1.99 ± 0.08 ²⁾	114.55 ± 11.80 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.2	1.58 ± 0.09 ²⁾	99.98 ± 8.48 ²⁾

2.3 对 T2DM 大鼠胰腺组织中 PERK, p-PERK 蛋白表达的影响

与正常组比较, 模型组大鼠 p-PERK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连组及盐酸二甲双胍组大鼠 p-PERK 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

2.4 对 T2DM 大鼠胰腺组织 GRP78, ATF4, CHOP 蛋白表达水平的影响

与正常组比较, 模型



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄连组; D. 盐酸二甲双胍组 (图 2~4 同)

图 1 各组大鼠胰腺组织中 PERK 和 p-PERK 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expression of PERK, p-PERK in pancreatic tissue of rats in each group

表 3 黄连对 2 型糖尿病大鼠 PERK, p-PERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effect of Coptidis Rhizoma on PERK and p-PERK in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PERK/ β -actin	p-PERK/ β -actin
正常	-	1.10 ± 0.16	0.22 ± 0.02
模型	-	1.08 ± 0.14	1.30 ± 0.121 ¹⁾
黄连	0.4	1.15 ± 0.18	0.55 ± 0.04 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.2	1.11 ± 0.12	0.51 ± 0.01 ²⁾

组大鼠胰腺组织中 GRP78, ATF4, CHOP 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连组和盐酸二甲双胍组 GRP78, ATF4, CHOP 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 2~4。

表 4 黄连对 2 型糖尿病大鼠 GRP78, ATF4, CHOP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effect of Coptidis Rhizoma on GRP78, ATF4 and CHOP in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ATF4	CHOP	GRP78
正常	-	6 454.10 ± 660.89	5 956.85 ± 574.89	3 080.76 ± 407.06
模型	-	28 958.26 ± 1 645.87 ¹⁾	33 933.55 ± 1 586.51 ¹⁾	24 726.37 ± 1 665.73 ¹⁾
黄连	0.4	20 927.88 ± 601.87 ²⁾	20 537.18 ± 1 231.74 ²⁾	14 747.41 ± 1 229.28 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.2	10 211.21 ± 284.06 ²⁾	7 978.36 ± 146.72 ²⁾	4 588.40 ± 398.33 ²⁾

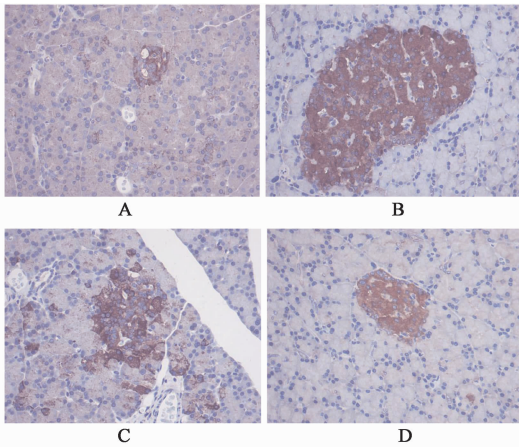


图 2 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺 GRP78 表达的影响(免疫组化, ×200)
Fig. 2 Effect of Coptidis Rhizoma on expression of GRP78 in pancreas of T2DM rats(IHC, ×200)

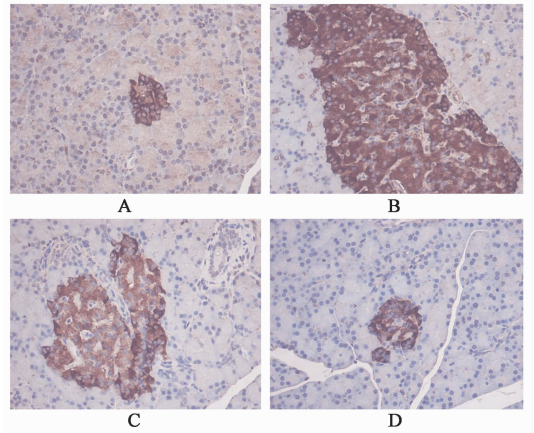


图 4 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺 CHOP 表达的影响(免疫组化, ×200)
Fig. 4 Effect of Coptidis Rhizoma on expression of CHOP in pancreas of T2DM rats(IHC, ×200)

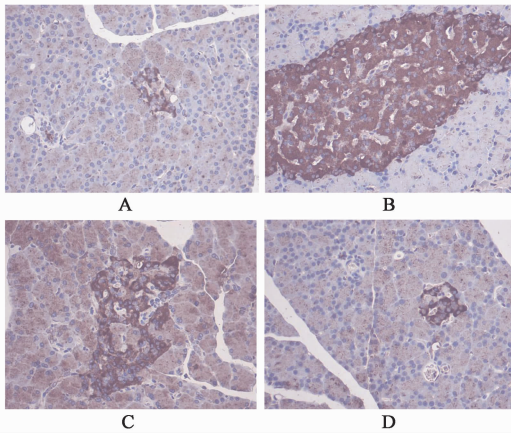


图 3 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺 ATF4 表达的影响(免疫组化, ×200)
Fig. 3 Effect of Coptidis Rhizoma on expression of ATF4 in pancreas of T2DM rats(IHC, ×200)

3 讨论

胰岛 β 细胞负责分泌人体唯一的降糖激素胰岛素, 承担着调节全身血糖平衡的生理任务, 所以胰岛 β 细胞需要高度发达的内质网系统来不断分泌胰岛素。内质网是细胞内蛋白质合成折叠、修饰加工与质量监控的重要场所, 其稳态平衡对于维持正常的细胞功能至关重要。若内质网中未折叠或者折叠发生错误的蛋白质累积过度, 胰岛 β 细胞会激活 ERS 实施自我修复。当人体处于生理状态时, PERK 与 GRP78 以无活性的复合物形式存在。在应激状态下, PERK 会与 GRP78 分离, GRP78 会结合错误折叠蛋白或未折叠蛋白。同时, PERK 自身磷酸化成 p-PERK, 进而磷酸化下游靶蛋白 eIF2 α 的位点, 使内质网翻译成蛋白功能减弱, 从而减轻内质网

负担。p-PERK 同时会激活 ATF4, 使氨基酸转运蛋白质表达增强, 对内质网稳态的恢复起到促进作用。但是当过度的 ERS 存在时, 胰岛 β 细胞就会处于失代偿状态诱导细胞凋亡。

本实验通过观察干预后各组大鼠胰腺中 PERK/ATF4/CHOP 信号通路相关蛋白的变化, 来推测黄连对胰腺 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的干预作用。有研究发现, 若 ERS 持续期过长或强度过大, 会增强 p-PERK, ATF4, GRP78 以及 CHOP 蛋白表达^[16-18]。实验结果提示, 与正常组比较, 其余三组大鼠 p-PERK, CHOP, ATF4, GRP78 表达量显著增高, 模型组蛋白表达水平最高, 说明经造模后的 T2DM 大鼠胰腺内质网应激程度都较正常大鼠显著增强。与模型组比较, 黄连组和盐酸二甲双胍组 p-PERK, CHOP, ATF4, GRP78 蛋白表达量显著下调, 说明经药物治疗后, PERK/ATF4/CHOP 信号通路的相关蛋白表达量下调, 抑制 PERK/ATF4/CHOP 信号通路, 黄连或者二甲双胍均能使内质网应激程度得到减轻。

有研究表明, 炎症因子如 TNF- α , CRP 等在胰岛素抵抗和糖尿病的发生发展有着密切联系^[19], 炎症因子 CRP 可通过调节核转录因子- κ B(NF- κ B) 介导的炎症反应加重胰岛素抵抗, TNF- α 通过降低胰岛素受体酪氨酸激酶活性等多种途径阻碍周围组织胰岛素作用而导致胰岛素抵抗反应^[20-21]。本实验研究发现, 在 CRP, TNF- α 方面, 黄连组、盐酸二甲双胍组较模型组均显著降低。由此可见黄连和二甲双胍均能减少人体炎症因子的分泌释放。相关研究证实, 黄连所含有效成分小檗碱对炎症反应的抑制

效果明显^[22]。由此得出结论,黄连可有效地降低 T2DM 大鼠血清中的 CRP 和 TNF- α 水平,对炎症反应加以抑制,进而使胰岛素抵抗状态得到改善。另外,与模型组比较,黄连组和盐酸二甲双胍组的血糖显著降低,说明黄连对 T2DM 大鼠有降糖作用。

综上所述,通过此次研究能够明确,黄连对 T2DM 大鼠具有降糖、减少炎症因子表达的作用,且能下调 ERS 信号通道 PERK/ATF4/CHOP 相关蛋白表达,进一步证实,黄连可抑制 PERK/ATF4/CHOP 信号通路,从而减轻 ERS 程度。下一步研究可涉及胰岛素抵抗和胰岛细胞凋亡方面的相关指标检测,来阐述黄连是否可以通过抑制内质网应激来发挥保护胰岛 β 细胞的作用,为黄连在临床上的应用提供更为完善的理论依据和实验基础。

[参考文献]

[1] 李锋,刘中国. 降糖药不良反应 425 例分析报告[J]. 山西医药杂志,2018,47(14):1715-1717.

[2] 周莉萍,张效科,王飞. 中药防治糖尿病认知功能障碍的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019, doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191137.

[3] 赵炜,赵焕虎,赵娟娟,等. 中药治疗糖尿病用药规律的文本挖掘[J]. 中国民族民间医药,2018,27(3):7-10.

[4] 梁雷,边宝林,王宏洁. 中药降血糖活性成分研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):227-230.

[5] 盖晓红,刘素香,任涛,等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2018,49(20):4919-4927.

[6] 罗婷婷,鲁媛,严诗楷,等. 基于网络药理学的黄连干预 2 型糖尿病潜在靶点研究[J]. 中药材,2019, doi:10.13863/j.issn1001-4454.2019.01.042.

[7] 陈瑶. 黄精对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及 TNF- α 水平影响的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2018.

[8] 许岭翎,张化冰,李伟,等. 糖脂异常是初发 2 型糖尿病并发肾病的危险因素[J]. 中国临床医生杂志,2015,43(9):20-22.

[9] 张宁,李自辉,于卉,等. 玄参及其各组分的降血糖作用[J]. 中药药理与临床,2016,32(5):55-60.

[10] 刘培,王鹏飞,王科,等. 基于 PI3K/Akt 通路的中药治

疗糖尿病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):220-228.

[11] Maggs D, MacDonald I, Nauck M A. Glucose homeostasis and the gastrointestinal tract: insights into the treatment of diabetes diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2007, 10(1):18-33.

[12] 赵炎. 小檗碱对胰岛素抵抗大鼠内质网应激的影响[D]. 武汉:华中科技大学,2010.

[13] 王功玲,文芳,曹仁贤. 肿瘤坏死因子 TNF- α 影响胰岛素信号传导的机制[J]. 南华大学学报:医学版,2006,34(2):289-290,308.

[14] 侯丹,许光远,张苗,等. 红景天苷改善糖尿病大鼠肝脏糖脂水平的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):130-134.

[15] 王丽敏,于静,赵夜雨,等. 小柴胡汤对 CFA 大鼠滑膜组织 NF- κ B 信号通路作用的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2019, doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191401.

[16] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004,11(4):381-389.

[17] Schroder M, Kaufman R J. The mammalian unfolded protein response[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74:739-789.

[18] 白明,刘保松,彭孟凡,等. 基于数据挖掘和网络药理学的 2 型糖尿病用药规律及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):182-188.

[19] 周迪夷,牟新,周旦阳,等. 清热益气中药对自发性 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞凋亡与炎症因子表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(5):1113-1116,1346.

[20] 戴建峰,陈美娟,郭睿,黄连素对 2 型糖尿病大鼠 CRP、IL-6、TNF- α 、脂联素的影响[J]. 中国伤残医学,2014,22(5):34-36.

[21] 陆亚. 血清 CRP、TNF- α 、IL-6 与 2 型糖尿病胰岛素抵抗及血脂水平的相关性研究[J]. 牡丹江医学院学报,2016,36(5):47-49.

[22] 张敬升,黄伟,谢鸣. 小檗碱对体外 HepG2 细胞 IR 模型抗 IR 的效应及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(21):138-143.

[责任编辑 孙丛丛]