

基于 AMPK/ACC 信号通路探讨夏枯草提取物 调节 ZDF 大鼠脂代谢的机制

田硕¹, 吴丽丽^{1*}, 张卫华^{2*}, 董笑克³, 韩艺凡³, 洪明昭⁴

(1. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029; 2. 北京宝德润生医药科技发展有限公司, 北京 100088; 3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;
4. 深圳市光明新区人民医院, 广东深圳 518106)

[摘要] 目的:观察夏枯草提取物(*Prunellae Spica extracts*, PS)对 Zucker 糖尿病肥胖(ZDF)模型大鼠肝腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)信号通路的影响以探讨其改善大鼠脂代谢的机制。方法:32 只雄性 ZDF(fa/fa)2 型糖尿病模型大鼠随机分为模型组、二甲双胍组(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和 PS 低、高剂量组(12.25, 24.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 8 只。8 只 Zucker Lean(ZL)大鼠设为正常组。于给药 0, 4, 8 周测体质量及空腹血糖。给药 8 周后, 腹主动脉取血, 离心抽取血清 -20℃ 冻存, 取肝组织 -80℃ 冻存, 及 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋。放射免疫法测血清甘油三酯(TG), 胆固醇(CHO), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及游离脂肪酸(FFA)。油红 O 染色观察肝细胞脂滴含量。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝脏 AMPK α_2 及 ACC mRNA 表达。免疫组化法测肝细胞磷酸化(p)-AMPK α 蛋白表达。结果:与正常组比较, 模型组大鼠血清 TG, CHO, LDL-C 及 FFA 升高, 肝细胞脂滴增加, 肝 AMPK α_2 mRNA 表达减少而 ACC1 和 ACC2 mRNA 表达增加, p-AMPK α 蛋白表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, PS 低、高剂量组可明显降低 ZDF 大鼠血清 TG, CHO, LDL-C 及 FFA, 减少肝细胞脂滴, 上调肝 AMPK α_2 mRNA 且下调 ACC1 和 ACC2 mRNA 表达, 上调 p-AMPK α 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:PS 能有效改善 2 型糖尿病 ZDF 大鼠肝脏脂代谢紊乱, 其机制可能与调节肝 AMPK/ACC 信号通路有关。

[关键词] 夏枯草提取物; 2 型糖尿病; 脂代谢; 胰岛素抵抗; 肝腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0082-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190806

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1045.001.html>

[网络出版时间] 2019-01-03 11:42

Mechanism of *Prunellae Spica* Extracts on Lipid Metabolism in ZDF Rats Based on AMPK/ACC Signalling Pathway

TIAN Shuo¹, WU Li-li^{1*}, ZHANG Wei-hua^{2*}, DONG Xiao-ke³, HAN Yi-fan³, HONG Ming-zhao⁴

(1. Health Cultivation Laboratory Under the Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Beijing Body Revival Medical Technology Co. Ltd., Beijing 100088, China;
3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
4. Guangming New District People's Hospital, Shenzhen 518106, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of *Prunellae Spica* extracts (PS) on the lipid metabolism in Zucker Diabetes Fatty (ZDF) rats based on AMP-activated protein kinase/acetyl CoA carboxylase (AMPK/ACC)

[收稿日期] 20180812(003)

[基金项目] 北京中医药大学 2018 年度基本科研业务费重点实验室项目(2018-JYB-JS)

[第一作者] 田硕, 硕士, 从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究, E-mail: 583049134@qq.com

[通信作者] * 吴丽丽, 博士, 助理研究员, 从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究, Tel: 010-64286950, E-mail: qingniao_566@163.com; * 张卫华, 硕士, 高级工程师, 从事中药新剂型、中药新药、中药保健食品研究开发, E-mail: strong_ng_zzz@163.com

signaling pathway. **Method:** The 32 male ZDF (fa/fa) type 2 diabetic rats were randomly divided into model group, metformin group ($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and low and high-dose PS groups ($12.25, 24.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 8 in each group. 8 male Zucker Lean (ZL) rats were selected as normal group. Body weight and fasting blood glucose were monitored at the 0th, 4th and 8th weeks after administration. After 8 weeks, abdominal aorta blood was collected, serum was frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ by centrifugation, liver tissue was frozen at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Serum triglyceride (TG), cholesterol (CHO), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and free fatty acid (FFA) levels were measured by radioimmunoassay. Fat droplets in hepatocytes were measured by oil red O staining. Gene expressions of AMP-activated protein kinase-alpha 2 ($\text{AMPK}\alpha_2$), Acetyl CoA carboxylase (ACC) in liver were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Protein expressions of p- $\text{AMPK}\alpha$ were observed by immuno-histochemical (IHC) method. **Result:** Compared with the normal group, the T2DM model group showed significant increases in serum levels of TG, CHO, LDL-C, FFA and lipid droplets in hepatocytes. $\text{AMPK}\alpha_2$ mRNA expression was decreased, while ACC1 and ACC2 mRNA expressions were increased significantly. p- $\text{AMPK}\alpha$ protein expression in liver was decreased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, low and high-dose Ps groups showed significant decreases in serum levels of TG, CHO, LDL-C, FFA and lipid droplets in hepatocytes in ZDF rats, up-regulation in mRNA expression of $\text{AMPK}\alpha_2$, down-regulation in mRNA expressions of ACC1 and ACC2, and up-regulation in protein expression of p- $\text{AMPK}\alpha$ ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** PS can effectively improve liver lipid metabolism in ZDF rats. Its mechanism may be related to the regulation of AMPK/ACC signaling pathway in liver.

[Key words] Prunellae Spica extracts; type 2 diabetes mellitus; lipid metabolism; insulin resistance; AMP-activated protein kinase/acetyl CoA carboxylase (AMPK/ACC)

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是临床上最常见的慢性代谢性疾病之一,以持续高血糖为主要表现,常伴肥胖及高脂血症。T2DM 发病机制复杂,目前普遍认为与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 有关。肥胖是导致 IR 的重要因素之一,能量摄入与消耗失衡导致外周组织脂肪过度堆积而发生肥胖,进而引起糖脂代谢紊乱及胰岛素生物利用度下降。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种重要的能量感应酶,能负向调控糖异生及脂质合成等消耗三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的生物过程,在脂代谢中起关键的调控作用,是 T2DM 和肥胖的潜在治疗靶标^[1]。

专家指出,我国 T2DM 发病率逐年上升与肥胖率增长密切相关,在治疗方面应进行降糖、调脂、降压、控制体质量和改善生活方式等综合治疗^[2]。因此,寻求一种具有综合性疗效的药物意义重大。唇形科植物夏枯草药用部位为干燥果穗,现代研究发现其含有熊果酸、齐墩果酸等多种有效成分,具有降糖、降压、抗肿瘤及抗炎等广泛药理作用^[3]。目前研究提出其抗糖尿病的机制主要包括保护 β 细胞、提高胰岛素敏感性、抑制肠道 α -糖苷酶、抗炎和抗氧化应激等^[4-6]。有研究显示,齐墩果酸和熊果酸

还具有调血脂、抗肥胖的作用^[7];夏枯草能改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂代谢紊乱^[8]。但关于其调节脂代谢的机制尚无明确研究,本实验选用自发性 T2DM ZDF 大鼠为动物模型,通过观察大鼠肝脏腺苷酸活化蛋白激酶 α_2 (AMP-activated protein kinase-alpha 2, $\text{AMPK}\alpha_2$) 及乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC) 基因表达,并通过免疫组化法测肝细胞磷酸化 $\text{AMPK}\alpha$ (p- $\text{AMPK}\alpha$) 蛋白表达,探讨 PS 调节脂代谢的作用和机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠 32 只, ZL 大鼠 8 只, 11 周龄, 购自北京维通利华实验技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2016-0006。ZDF (fa/fa) 大鼠体质量 (350 ± 30) g, ZL 大鼠体质量 (290 ± 10) g。SPF 级条件下, 于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心饲养, 温度 (21 ± 2) $^\circ\text{C}$, 湿度 (60 ± 10)%, 12 h/12 h 光照-黑暗循环, 自由摄食、饮水。ZDF (fa/fa) 大鼠 pumina#5008 饲料 (蛋白质 26.85%, 脂肪 16.71%, 碳水化合物 56.44%) 诱导喂养, ZL 大鼠普通全价营养颗粒鼠饲料喂养。该实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理委员会 (编号 2017-071) 审查, 符合实验动物伦理委员会相关指导原则。

1.2 药物与试剂 盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 AAL7659);取夏枯草的干燥果穗,碎为粗粉,15 倍量提取用水,常压加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,滤液在 -80 ℃ 条件下真空浓缩,再加 2 倍量 95% 乙醇充分混匀,静置过夜,过滤,滤液在 30 ℃ 条件下减压浓缩为相对密度为 1.07 ~ 1.11 的浓缩液,干燥得黄棕色粉末,即夏枯草提取物(PS)。生药材 30 kg 提取得浓缩提取物粉末 1 kg,西安康诺化工有限公司提供,王杰药师鉴定,批号 KN161009。血糖试纸(日本京都公司,批号 GT1941);戊巴比妥钠(德国默克公司,货号 57330);油红 O 染色试剂盒(中国 Leagene 公司,批号 1221A17);逆转录试剂盒,Master Mix(美国 Promega 公司,批号分别为 00002315333,0000076581);AMPK α_1 (phospho T183) + AMPK α_2 (phospho T172) 抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab23875);羊抗兔二抗,DAB 工作液,trizol(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 SP-0023,AE111701,C-0010);苏木素,伊红染色试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G1140,G1100)。

1.3 仪器 GT1810 型血糖仪(日本京都公司);L340099 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);MULT + 型酶标仪(美国 Promega 公司);7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 模型建立及分组 适应性喂养 1 周,禁食不禁水 12 h,尾尖采血法测血糖,以“三多一少”症状且空腹血糖 $\geq 7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为成模标准^[2],成模大鼠共 32 只。随机分为模型组,二甲双胍组(180 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及 PS 低、高剂量组(12.25, 24.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 8 只。8 只 ZL 大鼠设为正常组。PS 剂量参考 2015 年版《中国药典》记载成人最大安全剂量,用体表面积法折算为大鼠剂量,药物溶于蒸馏水并超声至完全溶解,以 0.01 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 体积灌胃,模型组和正常组每日灌服等量蒸馏水,灌胃 8 周。普通饲料自由择食,正常饮水。

2.2 体质量及血糖监测 观察大鼠的一般情况。分别于 0 周,4 周和 8 周,禁食不禁水 12 h,次日清晨测大鼠体质量,尾尖采血法测大鼠空腹血糖。

2.3 组织取材 取材 8 周后,所有大鼠禁食不禁水 12 h,称体质量,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 抽取血清, -20 ℃ 冻存。取肝组织分别 -80 ℃ 冻存,及 4% 多聚甲醛固定,

石蜡包埋。

2.4 放射免疫法检测 各组大鼠甘油三酯(TG),胆固醇(CHO),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和游离脂肪酸(FFA)含量 取大鼠血清,所有操作均按照说明书进行。

2.5 油红 O 染色检测 肝脏脂肪含量 取肝组织冰冻切片(6 μm 厚度),10% 甲醛固定 10 min,去离子水中冲洗,60% 异丙醇浸洗 20 s,改良油红 O 染色液(加盖)密闭染色 10 min,60% 异丙醇分色,去离子水清洗,苏木素浸染 2 min,1% 盐酸-乙醇分化,自来水返蓝 10 min,去离子水清,滤纸吸干周围水分,甘油明胶封固。显微镜下观察并拍照,染色后肝细胞整体呈暗红色,脂滴呈橘红色,细胞核显示为蓝色。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件统计平均积分吸光度值。

2.6 Real-time PCR 检测 肝脏 AMPK α_2 及 ACC1, ACC2 mRNA 表达 取冻存肝组织,trizol 提取总 RNA,逆转录试剂盒进行逆转录得 cDNA。PCR 20 μL 反应体系,引物 18 μL + 样品 2 μL ,置于 Real-time PCR 仪进行反应,条件为 95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min(40 次循环);95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s 溶解。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。见表 1。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence primer of PCR

名称	序列	片段长度/bp
AMPK α_2	上游 5'-TGAAGATCGGACACTACGTGC-3'	101
	下游 5'-AACTGCCACTTTATGGCCTG-3'	
ACC1	上游 5'-CTTGGGTTGATGCTCCCATT-3'	116
	下游 5'-GCTGGCTTAAACCCCTCAT-3'	
ACC2	上游 5'-GAGGATGTTCAGGCCACTTAG-3'	167
	下游 5'-ATGAGTGTAGGCATGGGGCC-3'	
GAPDH	上游 5'-GTTACCAGGGCTGCCTTCTC-3'	168
	下游 5'-GGGTTTCCCGTTGATGACC-3'	

2.7 免疫组化检测 p-AMPK α 蛋白表达 取肝石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,triton 细胞通透,微波炉加热抗原修复,山羊血清封闭液,加一抗 p-AMPK α (1:50),置于 4 ℃ 冰箱过夜。第 2 天,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,加羊抗兔二抗,DAB 显色,苏木素复染,自来水冲洗,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件,计算平均积分吸光度。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对符合正态分布的数据,采用单因素方差分析。对不符合正态分布的数据,采用独立样本的非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PS 对 ZDF 大鼠一般情况的影响 喂养期间,正常组大鼠均较活跃,对抓取抵抗明显,毛色亮泽,正常进食饮水,垫料干燥。模型组大鼠肥胖,活动迟缓、反应迟钝,毛色干枯,出现明显的多食、多饮、多尿症状,垫料潮湿。与模型组比较,二甲双胍组及 PS 低、高剂量组大鼠一般状态均有明显的改善。

3.2 PS 对 ZDF 大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,给药前二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠体质量无显著差异;给药 4 周后,二甲双胍组和 PS 低剂量组体质量明显下降 ($P < 0.05$);给药 8 周后,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠体质量均显著下降 ($P < 0.01$)。用药各组间无统计学差异。见表 2。

表 2 PS 对 ZDF 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *Prunellae Spica* extracts on body weight in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	0 周	4 周	8 周
正常	-	290.39 ± 10.38	320.66 ± 4.53	358.50 ± 6.28
模型	-	345.81 ± 7.34 ¹⁾	371.34 ± 6.76 ¹⁾	388.50 ± 7.19 ¹⁾
二甲双胍	180	347.00 ± 5.47	360.39 ± 4.65 ²⁾	370.25 ± 7.34 ³⁾
PS	12.25	347.11 ± 12.12	357.60 ± 12.52 ²⁾	367.75 ± 11.54 ³⁾
	24.5	348.88 ± 7.98	358.73 ± 9.78 ²⁾	368.25 ± 10.79 ³⁾

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 3~7 同)。

3.3 PS 对 ZDF 大鼠空腹血糖的影响 与正常组比较,模型组大鼠空腹血糖显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,给药前二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠空腹血糖无显著差异;给药 4 周后,二甲双胍组和 PS 低剂量组空腹血糖明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$);给药 8 周后,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠空腹血糖均明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。用药各组间无统计学差异。见表 3。

3.4 PS 对 ZDF 大鼠血脂的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TG, CHO, LDL, FFA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠 TG, CHO, LDL 水平显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$);PS 低、高剂量组大鼠 FFA 水平显著下降 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 3 PS 对 ZDF 大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of *Prunellae Spica* extracts on fasting blood glucose in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	0 周	4 周	8 周
正常	-	3.54 ± 0.46	3.98 ± 0.59	5.24 ± 0.33
模型	-	14.95 ± 1.74 ¹⁾	20.10 ± 1.30 ¹⁾	23.98 ± 0.78 ¹⁾
二甲双胍	180	14.60 ± 1.63	17.91 ± 1.08 ³⁾	20.66 ± 1.60 ³⁾
PS	12.25	14.49 ± 3.60	18.29 ± 1.49 ²⁾	20.81 ± 2.16 ²⁾
	24.5	15.13 ± 1.94	18.69 ± 1.75	19.05 ± 3.47 ²⁾

表 4 PS 对 ZDF 大鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of *Prunellae Spica* extracts on blood lipid in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TG	CHO	LDL	FFA
正常	-	0.56 ± 0.04	2.68 ± 0.07	0.46 ± 0.04	0.51 ± 0.06
模型	-	5.85 ± 1.30 ¹⁾	6.38 ± 0.37 ¹⁾	1.06 ± 0.10 ¹⁾	1.41 ± 0.06 ¹⁾
二甲双胍	180	4.48 ± 0.31 ²⁾	5.64 ± 0.50 ³⁾	0.81 ± 0.11 ²⁾	1.48 ± 0.08
PS	12.25	4.47 ± 0.90 ²⁾	5.68 ± 0.52 ²⁾	0.84 ± 0.08 ³⁾	1.03 ± 0.21 ³⁾
	24.5	4.59 ± 0.56 ²⁾	5.62 ± 0.49 ³⁾	0.78 ± 0.06 ³⁾	1.24 ± 0.11 ³⁾

3.5 PS 对 ZDF 大鼠肝脏脂肪含量的影响 各组大鼠肝脏组织油红 O 染色,光镜下观察,可见正常组肝细胞形态正常,轮廓清晰,排列整齐致密,细胞核着色清晰,核圆、居中、质均,胞浆染色均匀,细胞内可见少量脂滴;与正常组比较,模型组细胞体积膨大,轮廓较模糊,排列散乱,细胞核染色变浅,细胞内脂滴数量明显增加,大小不一,以小泡性脂滴为主,并出现脂滴融合现象;与模型组比较,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组细胞形态、排列尚可,脂滴数量减少且直径较小。对各组脂滴染色进行计数并统计,模型组较正常组显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组显著降低 ($P < 0.01$)。表明 PS 具有降低 ZDF 大鼠肝脂含量的作用。见图 1,表 5。

表 5 PS 对 ZDF 大鼠肝脂滴油红 O 平均积分吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of *Prunellae Spica* extracts on average optical density of hepatic lipid in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	平均积分吸光度
正常	-	0.132 ± 0.016
模型	-	0.272 ± 0.019 ¹⁾
二甲双胍	180	0.183 ± 0.027 ³⁾
PS	12.25	0.194 ± 0.017 ³⁾
	24.5	0.181 ± 0.010 ³⁾

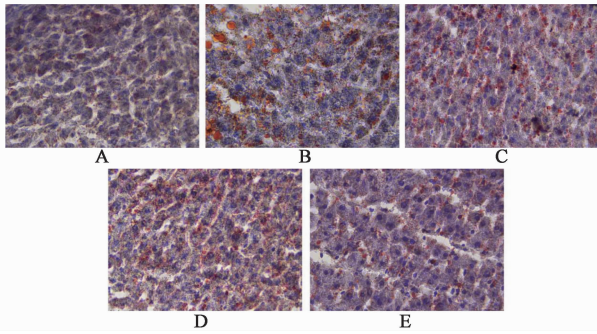


图 1 PS 对 ZDF 大鼠肝组织脂肪染色的影响(油红 O, ×400)

Fig.1 Effect of *Prunellae Spica* extracts on hepatic lipid in ZDF rats (oil red O, ×400)

3.6 PS 对 ZDF 大鼠肝组织 AMPK α_2 , ACC1, ACC2 mRNA 相对表达量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏 AMPK α_2 mRNA 表达显著下降($P < 0.01$), ACC1 和 ACC2 mRNA 表达显著上升($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组大鼠肝脏 AMPK α_2 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$), ACC1 和 ACC2 mRNA 表达显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),且用药各组间无显著差异。见表 6。

表 6 PS 对 ZDF 大鼠肝组织 AMPK α_2 , ACC1, ACC2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effect of *Prunellae Spica* extracts on AMPK α_2 , ACC1 and ACC2 mRNA of liver in ZDF rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AMPK α_2	ACC1	ACC2
正常	-	1.65 ± 0.34	0.42 ± 0.11	0.26 ± 0.12
模型	-	0.53 ± 0.13 ¹⁾	1.35 ± 0.21 ¹⁾	0.87 ± 0.33 ¹⁾
二甲双胍	180	0.89 ± 0.20 ³⁾	0.52 ± 0.19 ³⁾	0.55 ± 0.22 ³⁾
PS	12.25	0.98 ± 0.19 ³⁾	0.71 ± 0.28 ³⁾	0.57 ± 0.27 ²⁾
	24.5	1.02 ± 0.23 ³⁾	0.73 ± 0.38 ³⁾	0.44 ± 0.20 ³⁾

3.7 PS 对 ZDF 大鼠肝组织 p-AMPK α 蛋白表达的影响 光镜下观察,可见正常组大鼠肝脏边界清楚,肝脏细胞分布正常,细胞浆及细胞核中可见大量棕黄色 p-AMPK α 蛋白阳性表达;模型组肝脏细胞内可见少量棕黄色 p-AMPK α 蛋白表达。与正常组比较,模型组 p-AMPK α 蛋白表达显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和 PS 低、高剂量组 p-AMPK α 蛋白表达显著增多($P < 0.01$)。见图 2,表 7。

4 讨论

《本草纲目》记载:夏枯草,味苦、辛,性寒,

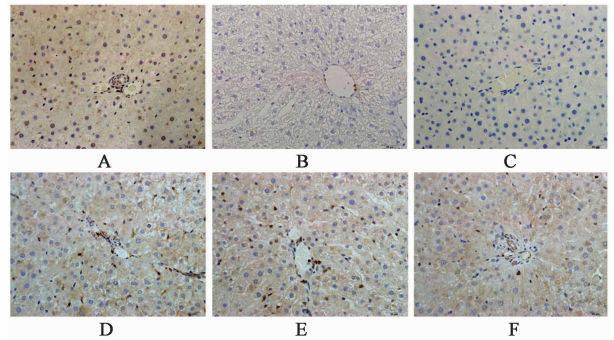


图 2 PS 对 ZDF 大鼠肝细胞 p-AMPK α 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.2 Effect of *Prunellae Spica* extracts on expression of p-AMPK α of hepatocyte in ZDF rats(IHC, ×200)

表 7 PS 对 ZDF 大鼠肝细胞 p-AMPK α 平均光密度值的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effect of *Prunellae Spica* extracts on average optical density of p-AMPK α in hepatocyte in ZDF rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-AMPK α
正常	-	0.439 ± 0.015
模型	-	0.125 ± 0.005 ¹⁾
二甲双胍	180	0.294 ± 0.018 ³⁾
PS	12.25	0.394 ± 0.015 ³⁾
	24.5	0.352 ± 0.022 ³⁾

归肝、胆经,无毒。具有清肝泻火,明目,散结消肿等功能,又云:“夏枯禀纯阳之气,补厥阴血脉。”《重庆堂笔记》言:“夏枯草,微辛而甘,故散结之中,兼有和阳养阴之功。”对现代医家提出从“热毒瘀”论治消渴的理论有一定针对性^[9-11]。研究发现夏枯草或用提取物或用于复方组方中,可表现出降糖、调脂、改善 IR 等作用。前期实验发现 PS 能有效调节 ZDF 大鼠肝糖原代谢并改善 IR^[12]。关于复方的研究,如有良好抗糖尿病疗效的验方糖耐康(组方为夏枯草、番石榴叶、三白草、人参、女贞子)具有清热生津、益气养阴的功效,被证明可有效调控 T2DM 患者^[13]及动物模型^[14]的糖脂代谢。又如复方夏枯草降糖胶囊(组方为夏枯草、山茱萸)^[15],其临床试验结果显示改善血糖血脂的作用,且安全性较高。ZDF 大鼠是自发 T2DM 动物模型,高脂饮食诱导后呈稳定的高血糖状态,并伴有 IR,肥胖,高脂血症及高血压等^[16],是研究糖脂代谢紊乱等代谢综合征的理想动物模型。本实验观察到,模型组大鼠存在明显的高血糖、肥胖及高脂血症,而 PS 组大鼠血糖、体质量及血脂均有明显改善。

AMPK 被成为“细胞能量调节器”,是一种高度

保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,以异源三聚体的形式存在,由催化性 α 亚基和调节性 β, γ 亚基组成,其中 α 亚基在糖脂代谢中起到主要作用^[17]。在哺乳动物中,AMPK α 由 PRKAA1 和 PRKAA2 基因编码为 α_1 和 α_2 两种异构体,它们在肝组织中均有表达。QIU 等^[18] 分别敲除小鼠 AMPK α_1 和 α_2 基因,发现仅在 α_2 基因敲除的小鼠中出现了高血糖及低胰岛素血症,证明 AMPK α_2 在糖脂代谢中起重要调控作用,并且在苏氨酸 172 (Thr172) 位点发生磷酸激活是其调节糖脂代谢的主要环节^[19]。AMPK 的上游分子主要包括肝激酶蛋白 B₁ (LKB₁) 和钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (CaMKK)。CaMKK 主要通过调节细胞内 Ca²⁺ 离子浓度而激活 AMPK; 当机体 ATP 生成减少消耗增加时,主要由 LKB₁ 激活 AMPK 信号通路的下游靶分子。ACC 是 AMPK 重要下游分子之一,其在脂肪酸的代谢过程中起重要作用,近年来在代谢综合征、肥胖及糖尿病研究中受到重视。ACC 在哺乳动物中有 ACC1 和 ACC2 两种同工酶,分别由 ACC1 和 ACC2 基因编码,其催化乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 的 ATP 依赖性羧化而形成丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA)^[20]。ACC1 主要存在于合成脂类的组织(如肝脏和脂肪)的细胞质中,ACC2 主要存在于发生氧化反应的组织(如肝脏、心脏、骨骼肌)的线粒体中^[21-22]。在肝脏中,ACC1 在细胞质形成的 Malonyl-CoA 主要用于脂肪酸 (FA) 的合成和延长^[23],而 ACC2 在线粒体表面形成的 Malonyl-CoA 主要通过肉毒碱棕榈酰转移酶 1 (CPT1) 抑制线粒体 FA 氧化代谢^[24]。ACC1 和 ACC2 在功能上可以相互代偿,小鼠肝脏特异性敲除 ACC1 基因及骨骼肌特异性敲除 ACC2 基因,其 FA 合成与氧化并未受到明显影响,目前 ACC 抑制剂也多是选择性抑制 ACC1 和 ACC2^[25]。当 AMP/ATP 升高时,LKB1 磷酸化 AMPK α 的 Thr172 位点使其活化^[26]。活化的 AMPK 通过磷酸化下游 ACC,而抑制其活性,同时降低 ACC mRNA 的表达^[27]。另外,胆固醇合成的限速酶 HMG-CoA 还原酶也是 AMPK 的下游分子之一,其被磷酸化失活可制胆固醇合成^[28]。AMPK 还参与其他通路及多种交叉通路,已证实 AMPK 能正向调控葡萄糖转运蛋白 1 和葡萄糖转运蛋白 4,促进外周组织对葡萄糖的摄取;磷酸化胰岛素受体底物的丝氨酸 789 位点而改善 IR;激活 PPAR- γ 而调节脂代谢;还能通过与 mTOR 和 sirtuins 相互作用而抗氧化。在细胞层面和整体层面调控机体能量平衡。

高能量饮食^[29]、瘦素缺陷^[30] 等可使细胞中 ACC mRNA 的表达增强导致 FA 合成增加。AMPK 信号通路激活后,ACC 表达减少、活性下降,直接抑制 FA 合成,促进 FA 氧化,以降低脂质在外周组织的沉积。许光远等^[31] 研究指出,上调 AMPK,ACC 蛋白磷酸化水平,下调固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP1c),虎龙斑斑脂肪酸合成酶 (FAS) mRNA 表达,能够显著降低 H4-II E 细胞体外 FFA 诱导肝细胞脂质沉积。本实验中,模型组大鼠 AMPK α_2 mRNA 表达减少,ACC mRNA 表达增加,血清 FFA 升高,与以往研究结果一致。PS 提高 ZDF 大鼠 AMPK α_2 mRNA 表达和 p-AMPK 的蛋白表达,减少 ACC mRNA 表达,从而降低肝细胞脂质沉积,减轻肝脏脂肪变性,提高胰岛素敏感性,改善脂代谢紊乱。综上所述,夏枯草提取物可能通过激活 AMPK/ACC 信号通路,有效改善 ZDF 大鼠脂代谢及 IR。

[参考文献]

- [1] Hardie D G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole body levels [J]. *Annu Rev Nutr*, 2014, 34(34):31-55.
- [2] 佚名. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(4):292-344.
- [3] 李咏梅,肖冰梅. 夏枯草的药用研究概述 [J]. *中国医药指南*, 2013, 11(19):479-480.
- [4] ZHENG J, HE J, JI B, et al. Antihyperglycemic activity of *Prunella vulgaris* L. in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16 (S1):427-431.
- [5] 吴慧平,陈美娟,郜明,等. 夏枯草水提物延缓正常 ICR 小鼠单糖吸收作用研究 [J]. *中药材*, 2010, 33 (5):782-785.
- [6] 谭剑斌,赵敏,杨杏芬,等. 夏枯草对氧化应激损伤的保护作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (4):89-94.
- [7] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸调血脂、抗肥胖药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(1):90-97.
- [8] 黎梅桂,魏刚,黄敏怡. 夏枯草对肥胖小鼠糖脂代谢的影响 [J]. *北方药学*, 2016, 13(3):118-120.
- [9] 陆付耳. 中医治疗糖尿病从强调“益气养阴”到兼顾“解毒扶阳” [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(4):293-295.
- [10] 庞博,赵进喜,王颖辉,等. 糖尿病清热解毒治法探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(7):1471-1474.
- [11] 于淼,朴春丽,南征. 2 型糖尿病胰岛素抵抗从毒损肝络论治的理论初探 [J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41

- (3):18-20.
- [12] 田硕,刘铜华,孙文,等.夏枯草提取物对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠肝糖原代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(10):101-106.
- [13] 王海焱,姜月滢,宋亚南,等.糖耐康颗粒干预糖尿病患者前期糖耐量异常临床观察[J].世界科学技术—中医药现代,2016,18(11):1839-1844.
- [14] 李林忆,吴欣莉,秦玲玲,等.基于能量限制效应考察中药复方糖耐康干预 db/db 小鼠胰岛素抵抗作用机制[J].中国科学:生命科学,2016,46(8):949-958.
- [15] 刘敬顺等.复方夏枯草降糖胶囊治疗 2 型糖尿病阴虚热盛证的临床研究[D].南京:南京中医药大学,2002.
- [16] Yokoi N, Hoshino M, Hidaks S, et al. A novel rat model of type 2 diabetes; the zucker fatty diabetes mellitus zfdm rat [J]. J Diabetes Res, 2013, doi: 10.1155/2013/103731.
- [17] Hardie D G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels [J]. Annu Rev Nutr, 2014, 34: 31-55.
- [18] QIU S L. AMP-activated protein kinase alpha 2 protects against liver injury from metastasized tumors via reduced glucose deprivation-induced oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2014, 289(13): 9449-9459.
- [19] Grahame H D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease [J]. Intern Med, 2014, 276(6): 543-559.
- [20] Wakil S J, Abu-Elheiga L A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome [J]. J Lipid Res, 2009, 50:S138-S143.
- [21] Kim K H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase [J]. Annu Rev Nutr, 1997, 17: 77-99.
- [22] Bianchi A. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase [J]. J Biol Chem, 1990, 265(3): 1502-1509.
- [23] Harwood H J. Jr Treating the metabolic syndrome: Acetyl-CoA carboxylase inhibition [J]. Expert Opin Ther Targets, 2005, 9(2): 267-281.
- [24] McGarry J D, Brown N F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis [J]. Eur J Biochem, 1997, 244(1): 1-14.
- [25] Harriman G, Greenwood J, Bhat S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(13): E1796-E1805.
- [26] Hawley S A, Fullerton M D, Ross F A, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase [J]. Science, 2012, 336(6083): 918-922.
- [27] 朱伟芬. 宫内营养不良及早期 GH 干预对大鼠 AMPK- α_1 /SREBP-1c/ACC-1 通路的影响及机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [28] Cho K, Kim S J, Park S H, et al. Protective effect of codonopsis lanceolata root extract against alcoholic fatty liver in the rat [J]. J Med Food, 2009, 12(6): 1293-1301.
- [29] 潘洪彬, 赵素梅, 黄英, 等. 饲料能量水平对乌金猪脂肪组织脂类合成代谢相关基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(5): 781-788.
- [30] LI J, Grigoryev D N, Ye S Q, et al. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice [J]. J Appl Physiol, 2005, 99(5): 1643-1648.
- [31] 许光远, 孙文, 郭璇, 等. 青钱柳总皂苷对游离脂肪酸诱导的 H4-II E 细胞脂肪代谢的影响及作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 124-129.

[责任编辑 周冰冰]