

实验研究

黄连解毒汤对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS-1 表达及酪氨酸磷酸化水平的影响

叶爱丽* 陆付耳* 徐丽君* 丁来标*

摘要 目的:观察黄连解毒汤对大鼠骨骼肌胰岛素受体底物 1(IRS-1)表达及其磷酸化水平的影响,探讨其改善胰岛素抵抗的分子机制。方法:采用小剂量链脲佐菌素尾静脉注射加高糖高脂饲料喂养方法建立 Wistar 大鼠胰岛素抵抗模型,以黄连解毒汤干预治疗 10 周,检测血糖和血清胰岛素,用免疫沉淀和 Western 印迹方法检测黄连解毒汤治疗后胰岛素抵抗大鼠骨骼肌组织内 IRS-1 蛋白表达水平和酪氨酸磷酸化水平的改变。结果:黄连解毒汤治疗后,胰岛素抵抗大鼠肌肉组织内 IRS-1 表达较模型组增加,IRS-1 酪氨酸磷酸化水平较模型组显著增加。结论:黄连解毒汤提高胰岛素抵抗大鼠骨骼肌组织 IRS-1 蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平,这可能是其降血糖并改善组织胰岛素敏感性的机制之一。

主题词 蛋白质酪氨酸磷酸酶/血液 胰岛素抗药性/中医药疗法 黄连解毒汤/治疗应用

Effects of Huanglian Jiedu Decoction on IRS-1 Expression and Tyrosine Phosphorylation Level in Skeletal Muscles of the Rats with Insulin Resistance

Ye Aili, Lu Fu'er, Xu Lijun, et al.

(Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

Objective: To observe effects of Huanglian Jiedu Decoction on expression of insulin receptor substrate 1(IRS-1) and the level of tyrosine phosphorylation in skeletal muscles to explore the molecular mechanism in improving insulin resistance. **Methods:** Wistar system insulin resistance model rats were developed with injection of small dose of streptozotocin into the caudal vein plus feeding by forage with high sugar and high lipids, and they were treated with Huanglian Jiedu Decoction for 10 weeks. Then blood sugar and serum insulin level were determined, and the changes of IRS-1 protein expression and tyrosine phosphorylation level in the skeletal muscles of the rat with insulin resistance after treatment of Huanglian Jiedu Decoction were detected with immunoprecipitation and Western Blot methods. **Results:** After treatment with Huanlian Jiedu Decoction, IRS-1 expression and IRS-1 tyrosine phosphorylation level in the muscular tissue increased as compared with those of the model group. **Conclusion:** Huanglian Jiedu Decoction improves IRS-1 protein expression and tyrosine phosphorylation level in the skeletal muscle tissue of the rats with insulin resistance, which is possibly one of the mechanisms of decreasing blood sugar and improving sensitivity of insulin in tissues.

Key Words Protein tyrosine phosphatase/blood; Drug-resistance of insulin/TCM therapy; Huanglian Jiedu Decoction/treatment application

随着现代社会人们生活方式和饮食结构的变化,2 型糖尿病的患病率仍在以较快的速度增长。胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病的特征。现代研究表明,中医药治疗糖尿病有较好的降糖作用,在改善症状和防治并发症上有一定的优势,并提示其治疗作用是多途径多环节的。如何发挥中医药优势,寻求既能有效改善胰岛素抵抗,而又无不良反应的单味中药或复方,是现代科学的重要研究方向。本研究所曾报道黄连解毒汤及其有效成分小檗碱具有显著的改善胰岛素抵抗、良好降糖和调节脂肪代谢的作用^[1];本实验旨在探讨黄连

解毒汤改善胰岛素抵抗的作用机制,观察黄连解毒汤对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌组织内胰岛素受体底物 1(IRS-1)蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂:黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子按 3:2:2:2 比例组成,其药材均购于武汉同济医院药剂科,按文献[2]方法煎煮浓汁,浓缩成浸膏(1g 浸膏相当于 1.5g 黄连解毒汤生药)。取浸膏送武汉药品检验所以薄层扫描方法测得其所含盐酸小檗碱为 21mg/g,黄连解毒汤临用前以 5%羧甲基纤维素的 PBS 溶液(pH7.4)配成含盐酸小檗碱 9.375g/L^[2]的混悬液;黄连素片为黑龙江百泰药业有限公司生产,同法制成含盐酸小檗碱 9.375g/L 的混悬液;阿司匹林片

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371816)

* 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所,湖北省武汉市解放大道 1095 号(430030)

收稿日期:2004-12-02;修回日期:2005-01-10

©1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由石家庄神威药业股份有限公司生产,配制成含阿司匹林 12g/L 的混悬液^[3]。血清胰岛素(INS)放免试剂盒购于北方生物技术研究所,链脲佐菌素为 Sigma 公司产品。一抗为 Upstate 公司产品,二抗购于中山生物技术有限公司,ECL 试剂盒为美国 PIERCE 公司产品。

1.2 动物分组及处理:健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 100 只,约 2 个月龄,体重(200±20)g,购于湖北省防疫站。动物先普食适应性喂养 1 周后,随机取 80 只大鼠按 30mg/kg 体重剂量尾静脉注射链脲佐菌素,普食喂养 2 周后,做口服糖耐量试验(OGTT)筛选糖耐量异常者共 63 只,随机分成 4 组。黄连解毒汤组(HLJD 组):16 只,按 1ml/100g^[4]体重剂量给大鼠灌服上述黄连解毒汤浸膏悬液,每日灌胃 1 次(以下各组灌服药液容积及次数与此同);黄连素组(BER 组):15 只,灌服盐酸小檗碱悬液;阿司匹林组(ASP 组):16 只,灌服阿司匹林悬液;模型组(MOD 组):16 只,灌服含 5%羧甲基纤维素的 PBS 溶液。以上 4 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)。另 16 只大鼠不做任何处理,以普通饲料喂养,作为正常对照组(NOR 组)。大鼠给药 10 周,末次给药后禁食 12 小时作 OGTT 试验,大鼠灌服葡萄糖(2.2g/kg)前及后 1、2 小时分别经断尾采血,测其空腹血糖(FBG),空腹胰岛素(Fins),葡萄糖负荷后 1 小时血糖(BG-1h),2 小时血糖(BG-2h)。OGTT 试验结束后继续饲养 1 周,禁食 12 小时,用 60mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,门静脉推注胰岛素 5U/kg,注射 90 秒取附睾脂肪组织,100 秒取后肢骨骼肌,迅速冻存于液氮中,然后-70℃保存。

1.3 生化指标的检测:检测 FBG、BG-1h 及 BG-2h 和 Fins。血糖仪为强生医疗器材有限公司产品,血糖试纸为该公司 Surestep 型。血清胰岛素用放免法测定,严格按试剂盒说明书进行。

1.4 IRS-1 蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平的检测:采用免疫沉淀和 Western 印迹方法,取各组大鼠胰岛素刺激前后的肌肉组织用组织裂解液裂解并匀浆;然后

在 4℃以 15000 转/分钟离心 30 分钟,取上清作样本,并用考马斯亮蓝 G-250 蛋白定量测定其蛋白浓度,然后-70℃保存。取各样品蛋白质 2mg,加 4μg 抗 IRS-1 抗体 4℃过夜后加入蛋白 A-琼脂(Protein A-agarose)4℃孵育 3 小时。洗涤免疫沉淀复合物后加入 Laemmli 上样缓冲液煮沸 5 分钟,6%SDS-PAGE 分离蛋白,电转移法使蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用含 3%BSA 的 TBST 溶液(含 0.05%Tween-20)37℃封膜 1 小时后,分别加入用封闭液稀释的抗 IRS-1 抗体和抗磷酸酪氨酸抗体(4G10)4℃过夜。洗膜后加入用辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇 1 小时,洗膜后用增强化学发光法(ECL)显像曝光,应用光密度扫描仪测各条带密度。

1.5 统计学方法:应用 SPSS 软件的 *t* 检验进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠体重变化比较:各组大鼠在基础状态时体重无明显差异,但在喂养 10 周后,黄连解毒汤组和阿司匹林组体重低于正常组和模型组,见表 1。

表 1 各组大鼠体重变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	基础体重	10 周时体重
NOR	16	209.69±40.81	280.21±40.98
MOD	16	211.47±22.05	285.17±56.27
HLJD	16	207.65±26.17	262.88±28.17*
BER	15	205.16±27.33	293.00±40.13
ASP	16	197.63±40.81	260.06±30.50*

与 MOD 组比较,**P*<0.01

2.2 各组大鼠 FBG、Fins 及糖耐量比较:模型组 FBG、BG-1h 及 BG-2h 均显著高于正常组(均 *P*<0.05),Fins 低于正常组(*P*<0.05);与模型组比较,黄连解毒汤组 FBG、Fins 及 BG-1h 均降低(均 *P*<0.05),黄连素组 Fins 显著低于模型组(*P*<0.05),阿司匹林组 FBG、Fins 及 BG-1h 水平较模型组降低(*P*<0.05),见表 2。

2.3 各组大鼠骨骼肌组织中 IRS-1 蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平的比较:(1)肌肉组织 IRS-1 蛋白表达水

表 2 各组大鼠 FBG、Fins 及糖耐量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FBG(mmol/L)	Fins(mIU/L)	BG-1h(mmol/L)	BG-2h(mmol/L)
NOR	16	4.07±0.38	27.04±5.11	5.41±0.61	4.78±0.63
MOD	16	5.51±1.28*	20.21±6.38*	10.28±5.56*	6.56±1.40*
HLJD	16	4.69±0.87△	12.50±3.62△	6.88±2.73△	5.82±1.72
BER	15	5.45±1.40	13.48±3.54△	8.13±2.91	7.35±2.60
ASP	16	3.72±0.66△	15.21±4.09△	6.63±1.78△	5.60±1.28

与 NOR 组比较,**P*<0.05;与 MOD 组比较,△*P*<0.05

平;其 185KD 蛋白电泳条带经光密度扫描,在胰岛素刺激前后分别为正常组 13.45 与 23.75,模型组 18.65 与 19.54,黄连解毒汤组 20.13 与 24.32,黄连素组 18.74 与 25.36,阿司匹林组 22.84 与 24.68。模型组胰岛素刺激前后 IRS-1 蛋白表达无显著性差异,各治疗组胰岛素刺激后 IRS-1 蛋白表达均接近正常组。(2) 肌肉组织 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平:其 185KD 蛋白电泳条带经光密度扫描,在胰岛素刺激前后分别为正常组 2.45 与 10.65,模型组 6.62 与 5.32,黄连解毒汤组 6.65 与 11.54,黄连素组 4.85 与 7.36,阿司匹林组 5.84 与 9.68。模型组胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平较刺激前减少,正常组及各治疗组胰岛素刺激后 IRS-1 酪氨酸磷酸化均显著增加,且黄连解毒汤组和阿司匹林组接近正常组。

3 讨论

根据中医学理论及临床经验,我们曾提出糖尿病从“毒”论治的假说^[5]。糖尿病的“毒源”有三:过食肥甘致胃肠积热为毒;七情不畅,气滞血瘀转为热毒;外感六淫入里化为热毒。毒在糖尿病中的核心机制是“热毒”,其上灼肺津,中劫胃液,下耗肾水。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的重要生理机制之一;具有清热解毒作用的方药是否能改善胰岛素抵抗值得探讨。黄连解毒汤是清热解毒的经典代表方剂,余秀惠等^[6]曾报道黄连解毒汤治疗糖尿病有一定的疗效。代培良等^[7]用黄连解毒汤治疗四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠,发现其能明显降低四氧嘧啶小鼠的空腹血糖。我们的前期实验工作也证明黄连解毒汤能降低实验性 2 型糖尿病大鼠的血糖和血脂。本实验进一步探讨其改善胰岛素抵抗的作用机理。

胰岛素抵抗形成的机制十分复杂,多在遗传的基础上由各种环境因素诱导而产生。研究表明,胰岛素刺激包括骨骼肌在内的靶组织摄取利用葡萄糖是通过受体、IRS-1、PI3K 和 GLUT 等一系列信号转导过程完成的^[8],此信号转导过程的任何环节障碍均可引起胰岛素抵抗。现已明确,胰岛素经血液循环到达靶组织,并与其上的胰岛素受体 α 亚单位结合,激活胰岛素受体 β 亚单位从而发生自磷酸化。被激活的胰岛素受体 β 亚单位进一步磷酸化细胞内信号分子 IRS-1,后者被磷酸化后表现出一种特异性结合位点,能募集并激活下游含有 SH2 区域的蛋白质,使得信号以激酶链式反应下传。IRS-1 作为胰岛素受体信号转导起始的一个重要信号分子,其蛋白表达及酪氨酸磷酸化程度的降低可引起胰岛素生物效应的减弱,最终引起胰岛素抵抗。近年的研究也表明,肥胖伴胰岛素抵抗患者的骨骼

肌在接受胰岛素刺激后,IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平较正常人低,IRS-1 的含量也降低^[9]。

本实验采用小剂量 STZ 尾静脉注射加高糖高脂饲料喂养的方法建立胰岛素抵抗模型,观察黄连解毒汤对 IR 大鼠血糖和血清胰岛素的影响,从 IR 大鼠骨骼肌组织 IRS-1 在胰岛素刺激前后的蛋白表达及酪氨酸磷酸化水平的角度来探讨其作用机制。结果表明,与正常组比较,模型组大鼠的 FBG、BG-1h、BG-2h 均升高,提示本实验所用动物模型基本符合 IR 的特征和要求。与模型组比较,黄连解毒汤组 FBG、BG-1h 显著降低,Ins 水平也降低,提示黄连解毒汤能有效改善 IR 大鼠的糖耐量异常,提高胰岛素的敏感性。采用免疫沉淀和 Western 印迹方法对各组大鼠肌肉组织胰岛素刺激前后的 IRS-1 蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平的变化进行检测,通过对 IRS-1 的蛋白和酪氨酸磷酸化蛋白进行电泳分析,扫描其条带的光密度。结果显示,黄连解毒汤能有效改善肌肉组织中 IRS-1 的蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平,从而改善肌肉组织中胰岛素受体后信号传导,防治胰岛素抵抗。本实验初步阐明了黄连解毒汤通过改善胰岛素信号转导而防治胰岛素抵抗的作用机理,为临床应用清热解毒法防治胰岛素抵抗提供了理论依据。

参考文献

- 1 陆付耳,冷三华,屠庆年,等. 黄连解毒汤与黄连素对 2 型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的研究. 华中科技大学学报(医学版), 2002,31(6):662~665.
- 2 吴洪元,姜晓群,陈贤琼. 黄连解毒胶囊提取工艺研究. 中成药, 1998,20(1):1~3.
- 3 Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK β . Science, 2001,293(5535):1673~1677.
- 4 孙敬方主编. 动物实验方法学. 北京:人民卫生出版社, 2001:137~139,197~212.
- 5 陆付耳,王智民,郭爱群. 糖尿病从“毒”论治探讨. 中国中医基础医学杂志, 2002,8(5):315~317.
- 6 余秀惠,范中明. 黄连解毒汤治疗糖尿病 2 例. 江西中医药, 1996,27(1):24.
- 7 代培良,余得海. 黄连解毒汤降血糖作用的实验研究. 河南中医学院学报, 2004,19(2):36~37.
- 8 Wojtaszewski JF, Hansen BF, Kiens B, et al. Insulin signalling in human skeletal muscle: time course and effect of exercise. Diabetes, 1997, 46(11):1775~1781.
- 9 Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, et al. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. J Clin Invest, 1995,95(5):2195~2204.