

中药降糖复方水提取物对 KK-Ay 糖尿病小鼠骨骼肌糖代谢 PI3K/Akt 信号通路的影响

洪金妮, 黎巍威, 张 宁, 富 宏, 王学美*

北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034

摘要:目的 研究中药降糖复方水提取物(WEJTD)对自发性2型糖尿病(T2DM)模型 KK-Ay 小鼠骨骼肌糖代谢 PI3K/Akt 信号通路的影响。方法 将 KK-Ay 小鼠按随机数法随机分为5组:模型组、盐酸二甲双胍(MH, 250 mg/kg)组和 WEJTD 低、中、高剂量(2、4、8 g/kg)组, C57BL/6J 小鼠作为对照组, 每天 ig 给药1次, 共12周, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。给药12周后, 取小鼠血清, ELISA 试剂盒法检测胰岛素水平; Trizol 法提取肌肉组织中的 RNA, 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测磷脂酰肌醇激酶-3 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、葡萄糖转运蛋白-4 (GLUT-4)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、糖原合成酶 (GS)、胰岛素受体底物 (IRS-1) mRNA 水平。结果 与模型组比较, WEJTD 高、中剂量显著上调小鼠血清胰岛素水平、骨骼肌中 IRS-1 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.001); 高、中、低剂量均显著下调骨骼肌中 GSK-3 β mRNA 水平, 显著上调 PI3K、Akt、GLUT-4、GS mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 中药降糖复方通过上调 PI3K/Akt 信号通路, 减少糖原沉积, 刺激骨骼肌中葡萄糖转运。

关键词: 中药降糖复方; 2型糖尿病; 糖代谢; 骨骼肌; PI3K/Akt; 糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β); 葡萄糖转运蛋白-4 (GLUT-4); 糖原合成酶 (GS); 胰岛素受体底物 (IRS-1)

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)10-1397-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.006

Effect of water extract from Jiangtang Decoction on PI3K/Akt signal pathway of skeletal muscle metabolism in KK-Ay diabetic mice

HONG Jin-ni, LI Wei-wei, ZHANG Ning, FU Hong, WANG Xue-mei

Integrated laboratory of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: Objective To explore the effects of water extract from Jiangtang Decoction (WEJTD) on PI3K/Akt signal pathway of skeletal muscle metabolism in KK-Ay diabetic mice. **Methods** Totally 50 KK-Ay mice were randomly divided into five groups: model group, metformin (positive drug, 250 mg/kg) group, WEJTD low, medium, and high dose (2, 4, and 8 g/kg) group, with 10 C57BL/6J mice as normal group. The relative drugs were ig administered once a day for 12 weeks, and mice in control group and model group were perfused with distilled water of equal volume. After 12 weeks' oral administration, mice were executed to separate serum, serum insulin level was detected by ELISA kit method; RNA was extracted from muscle tissue by Trizol, and real-time PCR were used to detect the level of PI3K, Akt, GLUT-4, GSK-3 β , GS and IRS-1 mRNA. **Results** WEJTD can down-regulate concentration of insulin in serum and GSK-3 β mRNA in skeletal muscle ($P < 0.05$ and 0.001), and down-regulate mRNA of PI3K, Akt, IRS-1, GLUT-4, and GS in skeletal muscle ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). **Conclusion** WEJTD decreased glycogen deposition and stimulated glucose transport in skeletal muscle through upregulation of PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Jiangtang Decoction; Type 2 Diabetes; carbohydrate metabolism; skeletal muscle; PI3K/Akt; glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β); glucose transporter-4 (GLUT-4); glycogen synthase (GS); insulin receptor substrate (IRS-1)

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573763); 国家自然科学基金重点项目 (81530099); 北京市自然科学基金 (7172221); 国家重点研发计划 (2016YFE0116200)

作者简介: 洪金妮 (1991—), 女, 博士在读, 研究方向为中西医结合防治老年病。Tel: 18811771938 E-mail: hongjinni@bjmu.edu.cn

*通信作者 王学美, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合老年病防治研究。Tel: (010)83572351 E-mail: wangxuemei@bjmu@163.com

糖尿病是一种由于胰岛素分泌不足和/或作用缺陷引起的,以慢性高血糖为特征的代谢性疾病^[1]。2014年国际糖尿病联合会(IDF)统计,全球约有3.87亿糖尿病患者,预计2035年患病人数将高达5.92亿^[2-3]。骨骼肌在机体血糖调节过程中发挥重要作用,在胰岛素刺激下,75%的葡萄糖摄取在骨骼肌中完成^[4]。

生理情况下,胰岛素和胰岛素受体底物结合后激活其下游底物,将胰岛素信号转导至效应器,最终调节糖、脂肪和蛋白质等的代谢。三磷酸肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路是胰岛素作用的主要信号通路,Akt、糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)、葡萄糖转运蛋白-4(GLUT-4)为胰岛素信号通路中的调节因子。GSK-3 β 是糖原合成途径中的关键酶,通过使糖原合成酶(GS)磷酸化失活,抑制糖原合成,导致血糖升高。GLUT-4主要分布于骨骼肌、脂肪组织和心肌细胞的胞浆中,是胰岛素敏感的葡萄糖转运载体^[5],GLUT-4仅在胰岛素的信号刺激下,才能通过易位作用转运到细胞膜上,许多研究发现^[6],GLUT-4基因异常可导致胰岛素抵抗(IR)^[7];Akt磷酸化刺激GLUT-4转位和GSK-3 β 磷酸化,调节葡萄糖摄取、糖原合成、糖酵解等。

中药降糖复方是北京中医药大学第一医院中医、中西医结合科王学美教授治疗2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)的常用方,该方由地锦草、丹参、黄芪、黄连、知母等配伍组成,清热活血、益气养阴。前期临床研究发现,该方服用安全,能有效降低患者血糖水平,减少西药服用量,但具体机制有待进一步研究。本文通过研究中药降糖复方水提取物(water extract from Jiangtang Decoction, WEJTD)对KK-Ay小鼠血清胰岛素及骨骼肌糖代谢相关指标的影响,探讨其作用机制,为中药降糖复方的进一步研究开发提供思路。

1 材料

1.1 动物

健康C57BL/6J小鼠10只,雄性,9周龄,北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001;自发T2DM模型KK-Ay小鼠50只,雄性,9周龄,北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2014-0004。

C57BL/6J小鼠普通饲料饲养;KK-Ay小鼠高脂饲料饲养,饲料来自北京华阜康生物股份有

限公司,许可证编号SCXK(京)2014-0008。所有动物均自由饮水,在室温(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、12 h光照周期的SPF环境中适应性饲养1周。尾尖取血测小鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) $\geq$ 7.0 mmol/L或随机血糖 $\geq$ 11.1 mmol/L即视为糖尿病模型。

1.2 药物

地锦草(*Euphorbiae Humifusae Herba*)、丹参(*Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma*)、生黄芪(*Astragalus Radix*)、知母(*Anemarrhenae Rhizoma*)、黄连(*Coptidis Rhizoma*)生药,均购自北京大学第一医院中药房,经北京大学药学院屠鹏飞鉴定,鉴定结果合格。药材比例为3:4:2:2:1,取处方量药材,加7倍量水,浸泡1 h,加热回流提取2次,每次1 h,合并滤液,减压浓缩,干燥,得到水提物。提取率为34.48%,其中主要成分质量分数如下:丹酚酸B 8.49 mg/g生药、黄连碱 6.07 mg/g生药、巴马汀 0.26 mg/g生药、小檗碱 0.66 mg/g生药、毛蕊异黄酮苷 0.06 mg/g生药、知母皂苷B II 0.66 mg/g生药,用双蒸水配置成生药浓度为0.2、0.4和0.8 g生药/mL备用。

取盐酸二甲双胍(Metformin hydrochloride, MH,中美上海施贵宝制药有限公司,批号A-12611601008,规格25 g/100 g),1 g溶于40 mL双蒸水中,制成25 g/L的阳性给药液。ig体积均为0.01 mL/g体质量。

1.3 试剂及仪器

小鼠超敏胰岛素试剂盒(80-INSMSU-E01,ALPCO);Trizol(ambion,批号147201);cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems,批号00463285);第一链cDNA合成试剂盒(Thermo scientific,批号1610045)。

7500实时荧光定量PCR系统(Applied Biosystems);VELOCITY-18R型离心机(澳大利亚Dynamica公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

将KK-Ay小鼠按随机数法随机分成5组:模型组、MH(250 mg/kg)组和WEJTD低、中、高剂量(2、4、8 g生药/kg)组,每组10只,以C57BL/6J小鼠为对照组,每天ig给药1次,共12周,对照组和模型组ig等体积蒸馏水。WEJTD剂量设置标准:60 kg的成年人临床使用量为60 g/剂,换算为1 g生药/kg体质量,再根据人和鼠比例1:9.1换算

为等效剂量 9.1 g 生药/kg, 作为中剂量设计浓度梯度进行预实验, 最后选取合适的 3 个浓度 (2、4、8 g 生药/kg)。

2.2 ELISA 试剂盒法检测血清胰岛素水平

给药 12 周后, 小鼠禁食 4 h, 尾尖取血, 静置 2 h, 4 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清胰岛素水平。

2.3 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测肌肉组织中 mRNA 表达

Trizol 法提取肌肉组织中的 RNA, 逆转录成 cDNA, 用 7 500 qRT-PCR 系统进行实时定量, 引物

序列见表 1, 反应体系如下: SYBR Green mix 10.0 μ L, 双蒸水 8.0 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 反转录产物 1.0 μ L。扩增反应程序设置如下: 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s; 55 $^{\circ}$ C、45 s; 72 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。实验重复 5 次, 将待测基因与内参 GAPDH 的比值作为待测基因 mRNA 的相对表达量, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用单因素方差分析并用 LSD、SNK 和 Duttnet 做多重比较。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物情况

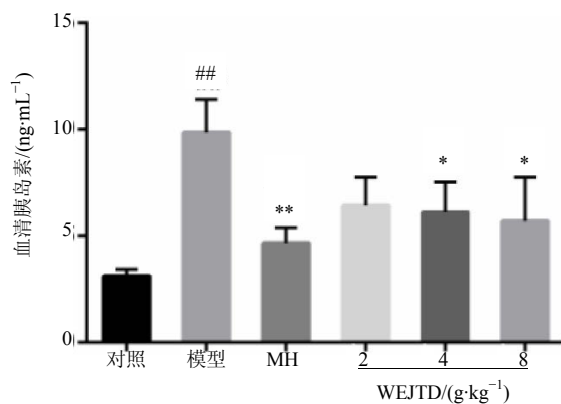
Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

基因	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
GAPDH	GGTGGAGCCAAAAGGGTCAT	CGTGGTTACACCCATCACA
PI3K	CGGCGTGACATGTAGGCTCTCA	ACGGCCCGCACTGTAACCTAT
AKT	TGTGACCATGAACGAGTTTGA	GTCGTGGGTCTGGAATGAGTA
GLUT4	GGCTCCCTTCAGTTTGGCTAT	ACGTTGCATTGTAGCTCTGTTCA
GSK-3 β	GCGATTTAAGAACCGAGAGC	GTCCAGCACCAGGTTAAGGT
GS	AAGAGTAACGTCACGTGTC	TGATGGAATACCCCAAGG
IRS-1	GGCAGCAATGAGGGCAACT	TGGAAGCTGATGCTGGCATA

3 结果

3.1 WEJTD 降低 KK-Ay 小鼠血清胰岛素水平

给药 12 周后, 与对照组比较, 模型组的血清胰岛素水平上升明显, 差异显著 ($P < 0.01$); MH 及 WEJTD 中、高剂量组的胰岛素水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈一定的剂量相关性。结果见图 1。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 1 WEJTD 对 KK-Ay 小鼠血清胰岛素的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of WEJTD on serum insulin in KK-Ay mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 WEJTD 上调骨骼肌 GLUT4 和 GS、下调 GSK-3 β mRNA 水平

如图 2 所示, 与对照组比较, 给药 12 周后, 模型组 GLUT-4 mRNA 下降, 说明糖尿病导致骨骼肌中葡萄糖转运受抑制。同时可见模型组中 GSK-3 β mRNA 水平较对照组显著上升 ($P < 0.05$), GS 水平下降 ($P < 0.05$), 可见糖尿病导致骨骼肌中糖原合成减少, 进而加剧糖尿病。而给药后 12 周, 与模型组比较, WEJTD 各剂量组显著上调 GLUT-4、GS mRNA 表达量, 下调 GSK-3 β mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 呈剂量相关性。结果提示, WEJTD 加速葡萄糖的转运及糖原和合成, 从而缓解糖尿病。

3.3 WEJTD 上调骨骼肌胰岛素受体底物 1 (IRS-1)、PI3K 及 Akt 的 mRNA 水平

如图 3 所示, 与对照组比较, 给药 12 周后, 模型组 IRS-1、Akt mRNA 水平有所下降, 差异显著 ($P < 0.05$)。与模型组比较, WEJTD 中、高剂量显著上调 IRS-1 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.001), 低、中、高剂量显著上调 PI3K、Akt mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈一定的剂量相关性。说明 WEJTD 改善糖尿病导致的胰岛素抵抗以及 PI3K/Akt 下调。

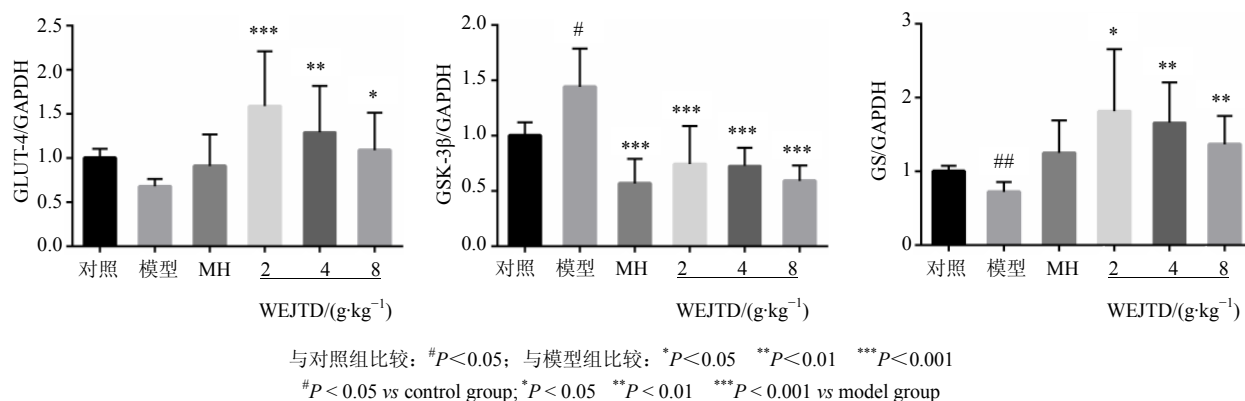


图2 WEJTD对KK-Ay小鼠骨骼肌中GLUT4、GSK-3 β 及GS mRNA的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 2 Effect of WEJTD on GLUT4, GSK-3 β and GS in skeletal muscle of KK-Ay mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

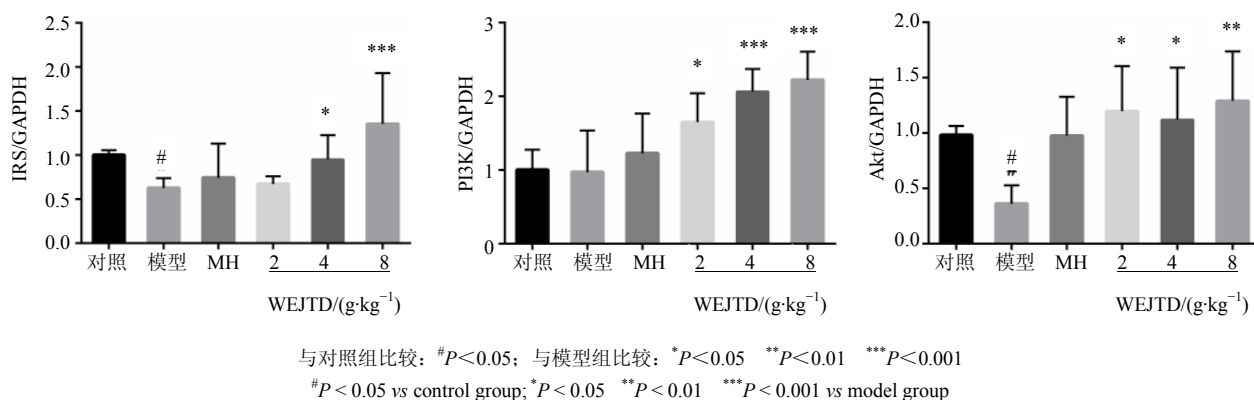


图3 WEJTD对KK-Ay小鼠骨骼肌中PI3K、Akt及IRS-1 mRNA的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 3 Effect of WEJTD on PI3K, Akt and IRS-1 mRNA expression in skeletal muscle of KK-Ay mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

糖尿病是一种代谢性疾病,随着人们生活水平的提高、生活方式的改变,糖尿病发病率日益升高,并呈低龄化趋势。糖尿病患者人群中约80%为T2DM, T2DM是以外周组织胰岛素抵抗为特征的代谢性疾病,而骨骼肌是胰岛素作用的主要靶组织^[8],对血糖调节起着重要作用,糖尿病时骨骼肌细胞新陈代谢严重下调、骨骼肌葡萄糖转运功能受损是导致全身胰岛素抵抗的重要原因,因此改善骨骼肌糖代谢对于糖尿病治疗至关重要。

PI3K是胰岛素信号途径重要分子,由催化亚基(p110)和调节亚基(P85)组成;Akt是PI3K/Akt通路活性的指标,也是多种胰岛素作用的关键信号蛋白,调节蛋白合成、糖原合成和GLUT-4易位,增加糖原合成和葡萄糖运输^[9],研究发现,PI3K/Akt通路是胰岛素代谢的主要通路。糖尿病时胰岛素信号通路受损,下调PI3K^[10],导致AKT磷酸化减少,

使磷酸化的GSK增多,进而磷酸化GS使其失活,糖原合成减少,导致血糖升高;胰岛素抵抗时骨骼肌组织中的GSK-3 β 蛋白水平也明显升高,这提示不仅PI3K/Akt, GSK-3 β 也参与了骨骼肌组织胰岛素抵抗的发生。GSK-3作为糖原合成途径中的关键酶,主要是通过磷酸化GS使其失活,阻止糖原合成,导致血糖升高。GSK-3分为GSK-3 α 和GSK-3 β 两种亚型,在骨骼肌中主要通过GSK-3 β 发挥作用。胰岛素与细胞膜胰岛素受体结合,促进IRS-1磷酸化,激活PI3K通路,进一步激活Akt使其磷酸化,进而促进GLUT4转位和GSK-3的去磷酸化,促进葡萄糖的摄取和糖原的合成。

本实验中,模型组小鼠与对照组比较,血清胰岛素水平降低,PI3K、Akt mRNA下调,说明小鼠的PI3K/Akt通路受抑制,GSK-3磷酸化,糖原合成减少,加剧糖尿病病变;另一方面,GLUT-4 mRNA水平降低,骨骼肌细胞转运和摄取葡萄糖能力降低。

WEJTD 增加血清胰岛素水平, 上调 IRS-1、PI3K、Akt mRNA, 进一步上调 GS、GLUT-4 表达, 促进糖原合成和葡萄糖摄取。

综上所述, 中药降糖复方组通过上调 PI3K/Akt, 减少糖原沉积, 刺激骨骼肌中葡萄糖转运, 改善糖尿病小鼠骨骼肌糖代谢。但部分机制尚未阐明, 有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 许曼音. 糖尿病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010.
- [2] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence in adults for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103(2): 137-149.
- [3] Beagley J, Guariguata L, Weil C, et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103: 150-160
- [4] Tsuda S, Egawa T, Ma X. Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle [J]. J Nutrit Biochem, 2012, 23(11):1403-1409
- [5] James D E, Brown R, Navarro J, et al. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein [J]. Nature, 1988, 333(333): 183-185.
- [6] Abel E D, Peroni O, Kim J K. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver [J]. Nature, 2001, 409(6821): 729
- [7] Kelley D E, Mintun M A, Watkins S C, et al. The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle [J]. J Clin Invest, 1996, 97(12): 2705-2713.
- [8] Zierath J R, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle [J]. Diabetologia, 2000, 43(7):821
- [9] Bruss M D, Arias E B, Lienhard G E. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity [J]. Diabetes, 2005, 54(1): 41.
- [10] Amin M M, Asaad G F, Salam R M A, et al. Novel Co Q10 antidiabetic mechanisms underlie its positive effect: modulation of insulin and adiponectine receptors, tyrosine kinase, PI3K, glucose transporters, sRAGE and visfatin in insulin resistant/diabetic rats [J]. PloS one, 2014, 9(2): e89169.