

- equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x long messenger ribonucleic acid levels [J]. *J Endoc*, 1995, 136(1): 232-241.
- [4] Mitry R R, Sarraf C E, Wu C G, *et al*. p53 Induces in Hep3B through up-regulation of bax expression [J]. *Lab Invest*, 1997, 77: 369-378.
- [5] Terada T, Nakanuma Y. Expression of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen, and apoptosis-related antigen (bcl-2, c-myc, Fas, Lewis (y) and p53) in human cholangiocarc in omas and hepatocellular carcinomas [J]. *Pathol Int*, 1996, 46: 764-770.
- [6] Zu-hua G, Maria S T, Wen-hua L, *et al*. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19: 533-540.
- [7] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, *et al*. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1 [J]. *Hepatol Res*, 2003, 27: 289-301.
- [8] Zhang T, Sun H C, Xu Y, *et al*. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 8557-8563.
- [9] Saito K, Takeha S, Shiba K, *et al*. Clinicopathologic significance of urokinase receptor and MMP-9-positive stromal cells in human colorectal cancer functional multiplicity of matrix degradation on hematogenous metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2000, 86(1): 24.

小檗碱对胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠葡萄糖激酶相关糖代谢的影响

荣太梓, 陆付耳*, 陈 广, 徐丽君, 王开富, 邹 欣

(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 武汉 430030)

摘要:目的 探讨小檗碱对胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠肝脏葡萄糖激酶(GK)相关糖代谢的影响。方法 观察小檗碱对实验性胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠空腹血糖、血清胰岛素(INS)、糖原、肝脏乳酸(LA)、GK活性及其蛋白表达的影响。结果 与模型组比较,小檗碱组大鼠血清空腹血糖水平明显降低,而INS、肝脏LA无明显变化,肝糖原合成增多、GK活性及其蛋白表达明显增高。结论 小檗碱能调节胰岛素分泌缺陷型糖尿病大鼠糖代谢,这可能与促进GK活性及其蛋白表达有关。

关键词:小檗碱; 胰岛素分泌缺陷; 葡萄糖激酶; 糖原

中图分类号:R286.72

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)05-0725-04

Effect of berberine on glucokinase and its related glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency

RONG Tai-zi, LU Fu-er, CHEN Guang, XU Li-jun, WANG Kai-fu, ZOU Xin

(Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of berberine on glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency. **Methods** The fasting blood glucose (FBG) was observed before and after treatment, insulin (INS), hepatic glycogen, lactic acid (LA), and the activity of hepatic glucokinase (GK) were detected after two weeks of treatment. At the same time the protein expression of hepatic GK was determined using Western blotting. **Results** In comparison with the model control, the FBG level of berberine group was obviously lowered, and the levels of hepatic glycogen and GK significantly were raised, while the level of INS and hepatic LA showed no evident difference. **Conclusion** It is suggested that berberine has the significant effect on improving glucose metabolism in rats with insulin-secretion deficiency, which might be closely correlated with the effects on activating the activity and the expression of GK that is a key enzyme of glucose metabolism.

Key words: berberine; insulin secretion deficiency; glucokinase (GK); glycogen

收稿日期:2006-09-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472254)

作者简介:荣太梓(1979—),男,河北唐山市人,硕士,从事中西医结合临床与科研工作。

Tel: (027) 83663304 (027) 63991563 E-mail: tz_r2006@yahoo.com.cn

* 通讯作者 陆付耳 Tel: (027) 83662220 E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn

小檗碱是传统中药黄连的主要有效成分。小檗碱的抗菌、抗炎作用及其临床应用已经众所周知,随着对小檗碱药理作用研究的不断深入,许多新的发现见诸报道,尤其是小檗碱的降糖作用成为近来关注的焦点^[1]。国内外众多研究表明,小檗碱的降糖作用主要在于改善胰岛素(INS)的敏感性^[2,3];本课题组曾首次报道,小檗碱的抗糖尿病效应尚可通过直接促进胰岛 β 细胞分泌 INS 而起作用^[4]。胰岛 β 细胞中的葡萄糖激酶(GK)受葡萄糖浓度调节,当血糖升高时,该酶活性升高,葡萄糖代谢加速。而肝脏中的 GK 受 INS 水平的调节,当血糖升高时,则血浆 INS 水平相应升高,GK 活性增强,糖原合成增加^[5]。如何解释小檗碱既有改善 INS 敏感性又有促进 INS 分泌的作用,其靶点何在?笔者曾提出假设,GK 可能是小檗碱的作用靶点。为了验证这一假设,本实验特选择 INS 分泌缺陷型大鼠为模型,探讨小檗碱对其 GK 相关糖代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂:盐酸小檗碱(常州亚邦制药有限公司,质量分数 99.3%),临用前用含 0.5% 羧甲基纤维素的 PBS 溶液(NaCl 136 mmol/L、 KCl 2.7 mmol/L、 Na_2HPO_4 pH7.4)配成含盐酸小檗碱 28.125 g/L 的混悬液;盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司生产)同法配制成含盐酸二甲双胍 9.175 g/L 混悬液。血糖试剂盒(购于北京北化康泰试剂有限公司),乳酸(LA)测试盒(购于南京建成生物工程研究所),血清胰岛素放免测试盒(购于中国原子能科学研究院),链脲佐菌素(*Streptozotocin*, STZ, 为 Sigma 公司产品)。

1.2 主要仪器:半自动化分析仪、紫外分光光度计、DYCZ-24 型垂直板电泳槽、BDF-1600 型双恒电流仪、DYY-7B 型转移电泳仪、WD-9405B 型摇床。

1.3 动物分组与造模:健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 46 只,约 2 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 38 只大鼠,尾 iv STZ 65 mg/kg;普食喂养 1 周后,尾静脉取血测空腹血糖,筛选空腹血糖 ≥ 16.65 mmol/L^[6]者 32 只,随机分成 3 组(模型组 11 只,小檗碱组 11 只,二甲双胍组 10 只)。小檗碱组按 562.5 mg/(kg·d) 给大鼠 ig 盐酸小檗碱混悬液,每天早晨给药 1 次(以下各组给药体积及次数与此相同);二甲双胍组按 184 mg/(kg·d) ig 二甲双胍混悬液;模型组 ig 含 0.5% 羧甲基纤维素的 PBS

溶液^[4]。以上 3 组在干预期间喂普通饲料,每天晚上 sc INS 1 次(按 16 U/kg sc 常规 INS)^[7,8]。另取 8 只大鼠不作任何处理,以普通饲料喂养,作为正常组。各组大鼠干预 2 周(因实验过程中有动物死亡,2 周后各组大鼠均剩余 8 只),末次给药后禁食 12 h,尾静脉取血分离血清测其空腹血糖,再用戊巴比妥钠 60 mg/kg ip 麻醉,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清分装, -20°C 保存,待测 INS。同时迅速取出肝脏,用消毒过的锡箔纸包好,放至 -80°C 冰箱中保存。

1.4 空腹血糖和 INS 的检测:空腹血糖采用葡萄糖氧化酶法测定,INS 采用放射免疫法测定,均严格按照相应试剂盒说明书进行操作。

1.5 肝组织 LA 检测:严格按试剂盒说明操作。

1.6 肝糖原检测:参照萘酮法操作。准确称取肝组织 100 mg,加 2 mL 5% 三氯乙酸(TCA),用电动匀浆器匀浆,于 4°C 冰箱过夜,取出于低温离心机在 4°C 、3 000 r/min 条件下离心 15 min,将上清液转移至另一 EP 管,取上清液 500 μL ,于冷水浴中加入 1.5 mL 萘酮试剂(称取 50 mg 萘酮,1 g 硫脲,加入到 100 mL 72% 的硫酸中)后摇匀,盖上试管胶塞并刺上注射器针头,转移到沸水浴中煮沸 10 min,再于自来水笼头下冲至室温,可见样品管及标准管在沸水浴中变为蓝绿色,于 620 nm 波长处测各管吸光度,空白管以 5% TCA 500 μL ,加萘酮 1.5 mL 同样本一同操作,作标准曲线,根据标准曲线计算出各标本肝糖原值。

1.7 肝脏 GK 活性检测:参考 Davidson 法^[9]。取肝组织 100 mg,放入预冷的塑料试管中剪碎,后加入 1 mL 组织匀浆液(pH 7.4, Tris·HCl 50 mmol/L, Hepes 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, MgCl_2 5 mmol/L, KCl 100 mmol/L, DDT 2.5 mmol/L),用匀浆机制成 10% 组织匀浆。在 4°C 下以 12 000 r/min 离心 15 min 沉淀微粒,用吸管吸去上层的脂肪层,吸 10 μL 上清液放入装有反应液(pH 7.4, Tris·HCl 50 mmol/L, Hepes 50 mmol/L, NADH 0.5 mmol/L, MgCl_2 7.5 mmol/L, KCl 100 mmol/L, DDT 2.5 mmol/L, 小牛血清白蛋白 10 mg/mL)的两个试管中,分别含 100 mmol/L 和 0.5 mmol/L 葡萄糖,在 37°C 水浴锅中孵育 10 min。然后用半自动化分析仪在 340 nm 测定吸光度,加入 G6PD 和 ATP(含 5 mmol/L),然后每隔 10 min 测一次吸光度(时间段中间放 37°C 水浴锅中孵育),计算高糖管与低糖管吸光度的差值,取各组平均值反映 GK

活性。

1.8 肝脏 GK 的蛋白表达:用 Western blotting 方法检测。取肝组织 100 mg 加入 1 mL 三去污组织裂解液,匀浆。在 15 000 r/min 和 4 ℃ 条件下离心 30 min,取上清液以考马斯亮蓝试剂盒测蛋白浓度。各组肝组织总蛋白上样量均为每孔 100 μg,2×上样缓冲液 (50 mmol/L Tris · HCl, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝,20% 甘油,10% β-巯基乙醇,pH 6.8),沸水中变性 5 min,SDS 胶 110V 恒压条件下电泳,200 mA 恒流转膜 4.5 h (不含 SDS)。硝酸纤维素膜用含 5% 牛奶的 TBST (取 5 mol/L NaCl 20 mL,1 mol/L Tris · HCl 10 mL,聚山梨酯-20 1 mL, pH 7.4,然后定容至 1 L) 封闭。GK 一抗以 1:2 000 稀释,4 ℃ 孵育过夜,用 TBST 洗膜 4 次,每次 15 min,再用兔抗山羊二抗 1:3 300 稀释,放室温在摇床上孵育 2 h,再用 TBST 洗膜 4 次,每次 15 min。在暗室中用 ECL 化学发光试剂盒进行检测。

1.9 统计学方法:用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠干预前后空腹血糖和 INS 测定结果:见表 1。与正常组比较,其他 3 组空腹血糖显著升高 ($P<0.01$),INS 显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,小檗碱干预组空腹血糖显著降低 ($P<0.05$),提示小檗碱具有降低 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠空腹血糖的作用。

表 1 小檗碱对 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠空腹血糖和 INS 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of berberine on fasting blood glucose and INS in diabetic rats with INS-secretion deficiency ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol · L ⁻¹)		INS/ (mU · L ⁻¹)
		给药前	给药后	
正常	—	3.82±1.01	7.09±2.02	40.31±13.18
模型	—	23.76±2.36**	25.33±7.38**	13.02±3.78**
二甲双胍	184	25.06±3.10**	25.32±9.24**	12.10±5.18**
小檗碱	562.5	25.99±2.59**	17.38±3.69**△	13.93±6.05**

与正常组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$

** $P<0.01$ vs normal group; △ $P<0.05$ vs model group

2.2 各组大鼠肝脏 LA 及糖原测定结果:见表 2。各组大鼠肝脏 LA 水平无明显变化;与模型组比较,小檗碱组肝糖原明显增高 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠肝脏 GK 活性的结果:见表 2。与正常组比较,模型组大鼠肝组织 GK 活性明显降低 ($P<0.01$);而与模型组比较,小檗碱组肝组织 GK 活性则明显升高 ($P<0.05$);提示小檗碱具有促进 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠肝组织 GK 活性的作用。

表 2 小檗碱对 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠肝脏 LA、糖原及 GK 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of berberine on hepatic LA, glycogen, and GK activity of diabetic rats with INS-secretion deficiency ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	LA/ (mmol · g ⁻¹)	肝糖原/ (mg · g ⁻¹)	GK 活性/ (min · mg ⁻¹)
正常	—	0.28±0.08	10.29±2.52	15.17±5.03△△
模型	—	0.22±0.50	14.58±4.14	7.53±4.59
二甲双胍	184	0.26±0.07	15.34±6.17*	8.54±2.94
小檗碱	562.5	0.25±0.66	20.37±3.06**△	12.84±3.88△

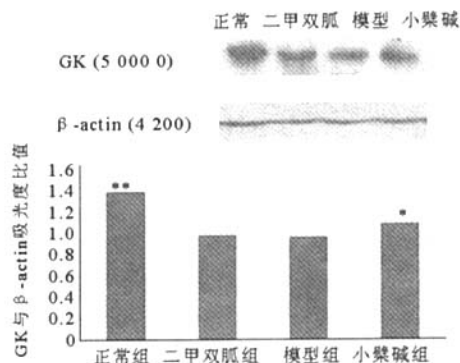
与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

2.4 各组大鼠肝脏 GK 的蛋白表达结果:对各组大鼠肝脏 GK 的蛋白电泳条带进行扫描分析,结果见图 1。与正常组比较,模型组大鼠肝组织 GK 的蛋白表达明显降低 ($P<0.01$);而与模型组比较,小檗碱组肝组织 GK 的蛋白表达则明显升高 ($P<0.05$);提示小檗碱具有促进 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠肝组织 GK 的蛋白表达作用。



与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

图 1 各组大鼠肝脏 GK 的蛋白表达

Fig. 1 Protein expression of hepatic GK of rats among groups

3 讨论

小檗碱是从小檗碱属植物黄连根茎中提取的一种季胺类化合物,属异喹啉生物碱,近年来许多临床和实验研究证实,它能降低血甘油三酯、总胆固醇和载脂蛋白 B 水平;显著改善糖耐量和 INS 抵抗。陈其明等^[10]用其干预四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠,发现能明显降低小鼠的血糖。本实验室前期工作证明小檗碱能降低实验性 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖,并能促进 INS 分泌^[3,4];从而证实小檗碱具有改善

INS 抵抗和改善 INS 分泌的双重作用,但是小檗碱对糖代谢的具体环节或作用靶点需要进一步探讨。

血糖的调节非常精细而复杂,血糖升高,可以刺激胰岛 β 细胞分泌 INS;INS 浓度升高,又可以降低血糖。血糖稳态是保证器官组织生理功能正常的关键,而 GK 对维持血糖稳态起着重要作用。GK 是一种己糖激酶,特异地存在于成熟肝细胞和胰岛 β 细胞中;GK 催化葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖,且不受 6-磷酸葡萄糖的反馈抑制,而此反应是葡萄糖在体内代谢的第一步反应。胰岛 β 细胞中 GK 与肝脏中的 GK 所发挥的作用显著不同。胰岛 β 细胞中的 GK 受葡萄糖浓度调节,当血糖升高时,则该酶活性升高,葡萄糖代谢加速。而肝脏中的 GK 受 INS 的调节,当血糖升高时,则血浆 INS 水平相应升高, GK 活性增强,糖原合成增加^[5]。由此可见,GK 参与了周围组织葡萄糖的利用,也与胰岛 β 细胞分泌 INS 有关。根据前述小檗碱对糖代谢的作用特点,推测 GK 可能是其重要的作用环节或作用靶点之一。

从小檗碱对 INS 分泌和肝细胞葡萄糖代谢有良好的调节效应和对其下游环节的效应来看,小檗碱与 GK 激动剂的活动与环节非常相似;因此,本实验采用尾 iv 大剂量 STZ 的方法建立 INS 分泌缺陷糖尿病大鼠模型,尽可能地切断胰岛 β 细胞分泌 INS 而调节糖代谢这条途径,从而仅从观察小檗碱对大鼠肝脏糖代谢及其对 GK 的影响入手,探讨其作用机制。研究表明,造模大鼠空腹血糖明显升高,2 周后造模组 INS 较正常组明显降低,而各组间无明显差异,提示本实验所用的动物模型符合 INS 分泌缺陷模型的特征和要求。本实验结果表明,小檗碱能显著降低 INS 分泌缺陷型糖尿病大鼠空腹血糖;同时小檗碱能直接促进肝脏 GK 的活性和蛋白表达,促进肝糖原的合成。肝脏 GK 不仅是糖代谢的限速酶,而且把肝糖中间代谢产物与血糖波动偶联起来,起着葡萄糖感受器的作用,其作用可能类似于磷酸化酶 a,可能激活糖原合成酶促进糖原合成。因此与模型组比较,小檗碱组的糖原合成显著增加。而正常组糖原偏低可能是由于其血糖偏低,底物少从而激活肝 GK 发挥糖原合成的作用相对较弱。但这并不意味着正常组 GK 活性不高(本实验中测得 GK 活性数据也恰恰证明了这一点),而是因为没有高血糖的刺激,它的底物少,使得糖原合成少。而各组大鼠肝组织 LA 水平无明显变化,应该是各组大

鼠主要是通过有氧化途径进行糖代谢,糖酵解途径糖代谢相对很少,因而生成 LA 的量无明显差异。本实验初步阐明了小檗碱可能通过促进肝脏 GK 活性和蛋白表达而降低血糖的作用机制。有些专家认为,1 型糖尿病患者应用胰岛素时,全身用药并不能完全模拟胰岛 β 细胞功能正常时的门脉高胰岛素血症,导致 INS 对肝脏的作用仍低于正常,也就不能很好地刺激肝脏 GK 产生,使 GK 仍处于低水平,不利于调节肝糖代谢。而小檗碱能直接促进肝脏 GK 活性及蛋白表达,促进糖代谢,这就为临床应用小檗碱治疗糖尿病和开发新药提供了理论依据。当然小檗碱尚可以通过 AMP-AMPK-p38 途径绕行 INS 信号途径和刺激糖的吸收,因此小檗碱的降糖机制也有待进一步探讨。

References:

- [1] Leng S H, Lu F E. Advances in the experimental study on the role of berberin in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(10): 794-795.
- [2] Gao C R, Zhang J Q, Huang Q L. Experimental study on berberin raised insulin sensitivity in insulin resistance rat models [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1997, 17(3): 162-164.
- [3] Lu F E, Leng S H, Tu Q N, et al. Comparative study on the effects of Huanglian Jiedu decoction and berberine on glucose and lipid metabolisms in type 2 diabetic rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech: Health Sci* (华中科技大学学报:医学版), 2002, 31(6): 662-665.
- [4] Leng S H, Lu F E, Xu L J. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(4): 496-502.
- [5] Zheng H T, Deng H C. Progress in the relationship between glucokinase and diabetes [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2002, 8(27): 5960-5961.
- [6] Yu D M, Wu R, Yi W. A study on experimental diabetes animal models induced by streptozotocin [J]. *Chin J Diabetes* (中华糖尿病杂志), 1995, 3(2): 105-109.
- [7] Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, et al. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of Streptozotocin-treated mice [J]. *Diabetes*, 2004, 53: 560-569.
- [8] Dong H J, Altomonte J, Morral N, et al. Basal insulin gene expression significantly improves conventional insulin therapy in type 1 diabetic rats [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 130-138.
- [9] Davison A, Arion W. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 253: 156-167.
- [10] Chen Q M, Xie M Z. Study on the effects of Huanglian and berberin in decreasing blood glucose [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1986, 21(6): 401-403.