

地黄寡糖对2型糖尿病大鼠肝脏糖代谢关键酶活性及基因表达的影响

张汝学¹, 贾正平^{1,2*}, 刘景龙^{1,2}, 周 琚^{1,2}, 邱建国¹

1. 兰州军区兰州总医院 药剂科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 国家中医药管理局临床中药学重点学科, 甘肃兰州 730050

2. 兰州大学, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 通过研究地黄寡糖对2型糖尿病大鼠肝脏糖代谢关键酶活性和基因表达的影响, 揭示地黄寡糖治疗糖尿病的机制。 **方法** Wistar 雌性大鼠以高脂饲料喂养2月后, 一次性 ip 链脲佐菌素 (STZ) 30 mg/kg 诱发大鼠2型糖尿病。7 d 后大鼠分为模型组、地黄寡糖低和高剂量 (100、200 mg/kg) 组、二甲双胍阳性对照组, 每天 ig 给药1次, 连续4周, 另设对照组。给药4周后处死大鼠, 取肝脏检测肝糖原的量及葡萄糖激酶 (GK) 和葡萄糖-6-脱氢酶 (G-6-Pase) 活性, 用 RT-PCR 技术检测 GK 和 G-6-Pase 基因表达。 **结果** 与模型组相比, 地黄寡糖能显著增加肝糖原的量 ($P<0.01$), 增强 GK 活性 ($P<0.01$) 和基因表达 ($P<0.05$), 减弱 G-6-Pase 活性 ($P<0.01$) 及其基因表达 ($P<0.05$)。 **结论** 地黄寡糖可能通过改善糖尿病大鼠肝糖代谢关键酶活性及基因表达发挥治疗糖尿病作用。

关键词: 地黄寡糖; 糖尿病; 糖代谢; 关键酶; 葡萄糖激酶

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0316-05

Effects of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on activity and gene expression of hepatic glycometabolic key enzymes in type 2 diabetic rats

ZHANG Ru-xue¹, JIA Zheng-ping^{1,2}, LIU Jing-long^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, QIU Jian-guo¹

1. Clinical Pharmacy Key Discipline of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, PLA, Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China

2. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacological mechanism of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (RGO) on the activity and gene expression of hepatic glycometabolic key enzymes in type 2 diabetic rats. **Methods** Female Wistar rats were ip injected with STZ (30 mg/kg) after fed with high lipid food for two months, then rats were divided into model, RGO low- and high-dose (100 and 200 mg/kg), and positive control groups. Rats were killed after they had been ig administered once daily for four weeks, the content of the hepatic glycogen, the activity of GK and G-6-Pase were detected. Meanwhile, the gene expression of GK and G-6-Pase were determined by RT-PCR. **Results** Comparing with model group, RGO could improve the content of the hepatic glycogen ($P<0.01$) significantly, increase the activity ($P<0.01$) and gene expression ($P<0.05$) of GK, and reduce the activity ($P<0.01$) and gene expression ($P<0.05$) of G-6-Pase. **Conclusion** RGO exerts its anti-diabetic pharmacological effect by ameliorating the activities and gene expressions of hepatic glycometabolic key enzymes.

Key words: *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (RGO); diabetes; glycometabolism; key enzymes; glucokinase (GK)

糖尿病是以长期高血糖为主要特征的代谢综合征, 发病率高, 范围广, 对人类危害极大。目前对糖尿病的治疗主要以西药为主, 但西药治疗存在继发性失效和严重的不良反应^[1]。中药治疗糖尿病虽

具有一定优势, 但其治疗糖尿病的机制研究还不够深入。地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 是一味传统中药, 在中国用于治疗糖尿病已有数千年历史^[2-3]。地黄寡糖是地黄的主要成分之一, 以往的研究表明

收稿日期: 2011-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772073; 81173620); 甘肃省自然科学基金资助项目 (3ZS051-A25-078)

作者简介: 张汝学 (1963—), 男, 甘肃文县人, 主任药师, 博士, 主要从事中药药理学研究工作。Tel: (0931)89994676 E-mail: ruxuezh@hotmail.com

*通讯作者 贾正平 Tel: (0931)89994652 E-mail: empriqq@public.lz.gs.cn

地黄寡糖可降低四氧嘧啶和链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠的血糖^[4-5],对去胸腺大鼠及老龄大鼠受损的糖代谢有改善作用^[6-7]。本研究地黄寡糖对STZ致糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用及其相关机制,以揭示地黄寡糖改善2型糖尿病的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

地黄寡糖(四聚糖占60%、三糖占20%,其余为单糖或二糖),兰州军区兰州总医院临床药理基地提供;STZ(批号S8050),购自Solarbio公司;盐酸二甲双胍(批号0703061),上海施贵宝制药有限公司。RNA抽提试剂Trizol、AMV第一条链合成试剂盒、PCR扩增试剂盒,上海生工生物工程(上海)有限公司;焦炭酸二乙酯(DEPC),Sigma公司;DNA Marker(DL1200和Marker1),广州东盛公司;琼脂糖,上海生工生物工程(上海)有限公司;NADPNa₂购自Solarbio公司;葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase),Solarbio公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

Wistar大鼠,雌性,普通级,体质量180~220 g,由兰州大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK甘2005-0007。

1.3 仪器

Biofuge Stratos 高速台式冷冻离心机,德国 Heraeus 公司;超净工作台,北京半导体厂;MG96G Long Gene PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司;HU6 型水平式电泳仪,英国 SCIE-PLAS 公司;UV Transilluminator 紫外分析灯,美国 UVP 公司;Vitalab 21 半自动生化分析仪,荷兰 VitalScientific 公司;BP210S 电子天平,赛多利斯有限公司;HP 8453 紫外分光光度计,美国惠普公司;IECMicromax 离心机,美国 ThermoElectron 公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

大鼠用高脂饲料(蛋黄2.5%、蔗糖20%、猪油10%、基础饲料67.5%)饲养2个月后,单次ip STZ 30 mg/kg,诱发糖尿病,在ip STZ前大鼠禁食16 h。ip STZ后3~7 d,检测血糖,血糖值大于14 mmol/L的大鼠纳入实验。将2型糖尿病模型大鼠随机分为模型组、地黄寡糖低剂量和高剂量(100、200 mg/kg)给药组及二甲双胍(200 mg/kg)阳性对照组,另设

对照组。各给药组每天ig给药1次,连续4周,对照组及模型组给予等量生理盐水。

2.2 标本采集及处理

末次给药后大鼠禁食不禁水6 h,处死大鼠,立即剥取大鼠肝脏,置液氮中冷冻后-70℃保存备用。

2.3 肝糖原测定

根据蒽酮-硫酸法^[8]进行,并建立标准曲线。

2.4 肝脏 G-6-Pase 活性的测定

100 mg 肝组织用 0.25 mol/L 蔗糖 1 mL 匀浆,粗匀浆在 4℃、10 400×g 离心 30 min,上清液用于 G-6-Pase 活性的测定。0.3 mL 的检测混合液包括 0.25 mol/L 蔗糖、1 mmol/L EDTA (pH 7.0)、0.1 mol/L 葡萄糖-6-磷酸盐和 0.1 mol/L 二甲胂酸盐缓冲液 (pH 6.5)。反应从加入 100 μL 酶液后开始,37℃ 温浴 5 min,然后加入 10%三氯乙酸(TCA) 2 mL 中止反应。冰浴冷却后离心,弃去沉淀。再取 0.5 mL 上清液,用钼酸盐法检测无机磷的量,根据酶活性单位定义计算 G-6-Pase 活性。

2.5 肝脏葡萄糖激酶(GK)活性测定

GK 活性测定采取 G-6-Pase 耦联比色法。肝细胞以匀浆缓冲液(取 Tris 6.057 g、KCl 6 g、MgCl₂ 0.508 g、EDTA 钠 20.931 g、0.25% Triton X-100 750 μL,调 pH 值至 7.5,加蒸馏水至 500 mL)制成匀浆,粗匀浆于 12 000×g、4℃离心 15 min,上清液用于酶活性测定。GK 反应体系为 3 mL,其中含 Tris-HCl 100 mmol/L、NADP⁺ 0.2 mmol/L、ATP 5 mmol/L、MgCl₂ 5 mmol/L、G-6-Pase 0.2 U, pH 为 7.5。每次测定设高糖管和低糖管(葡萄糖终浓度分别为 100、0.5 mmol/L),两者之差为 GK 活性。反应体系充分混匀后,37℃水浴 5 min,再加入肝细胞上清液 50 μL 进行反应。用蒸馏水调零,在波长 340 nm 处测定吸光度(A)值,每 30 s 记录 1 次,连续记录 3 min,测出每分钟 A 的增加值,并以高糖管测得值减去低糖管测得值,再根据公式计算 GK 活性。Bradford 法测定上清液的蛋白量。

2.6 RT-PCR 法检测相关基因表达

肝组织 100 mg 剪碎并加入 Trizol 液 1 mL 匀浆,充分振荡,移入 1.5 mL 离心管中,加入氯仿 0.2 mL,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加入 0.5 mL 异丙醇离心沉淀 RNA,倒去上清液,加入 75%乙醇 1 mL 离心洗涤 2 次,晾干,溶于 DEPC 处理水。逆转录在 0.2 mL Ep 管配制 RT-PCR 反应液,总量 20 μL[模板 RNA 1 μL、5×逆转录酶缓冲液 4 μL、dNTP

8 μ L、RNasin 2 μ L, 下游引物 212 μ L, AMV 2 μ L, 用无 RNA 酶水补至 20 μ L。高速离心 15 s 后, 65 $^{\circ}$ C、5 min, 42 $^{\circ}$ C、30 min, 95 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C、5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。聚合酶链反应 PCR: 在已消毒的 0.2 mL Ep 管中配制反应液, 总量为 50 μ L [cDNA 10 μ L、dNTP 2 μ L、Taq 0.15 μ L、10 $\times$ Taq 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, dd H_2O 1 μ L]。混匀后高速离心 15 s, 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、相应各基因退火温

度复性 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min、72 $^{\circ}$ C 再延伸 4 min, 共 30 个循环。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳后拍照, 用凝胶成像系统进行分析, 用目的基因和 β -actin 二者扩增条带的吸光度峰面积积分比值大小反映目的基因表达水平的高低。

2.7 引物设计及合成

根据 Genbank 公布的大鼠 mRNA 序列, 使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。见表 1。

表 1 引物设计及 PCR 过程
Table 1 Primer design and PCR process

引物	引物序列 (5'→3')	产物片断 / bp	退火温度 / $^{\circ}$ C
β -actin	上游 CTGTCCCTGTATGCCTCTG	218	59.72
	下游 ATGTCACGCACGATTTC		55.02
GK	上游 AAAGATGTTGCCACCTAC	542	52.10
	下游 GAAGTCCCACGATGTTGTT		52.30
G-6-Pase	上游 AATCTCCTCTGGGTGGC	108	51.70
	下游 GCTGTAGTAGTCGGTGTCC		49.50

2.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验。

3 结果

3.1 对肝糖原的影响

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠肝糖原的量明显下降达 40% ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地黄寡糖组糖尿病大鼠肝糖原升高, 其中高剂量组升高 47%, 作用最为显著 ($P < 0.01$); 二甲双胍亦有类似作用。结果见表 2。

3.2 对肝脏代谢关键酶活性的影响

与对照组比较, 2 型糖尿病模型组大鼠 G-6-Pase 活性上升; 与模型组比较, 地黄寡糖组糖尿病大鼠

G-6-Pase 活性下降, 其中高剂量组 G-6-Pase 活性下降更为明显 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组大鼠 GK 活性显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 地黄寡糖使下降的 GK 活性趋于正常, 其中高剂量作用更为显著 ($P < 0.01$)。二甲双胍对 G-6-Pase 和 GK 的作用与地黄寡糖类似。结果见表 3。

3.3 对糖代谢关键酶基因表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠 GK 基因表达明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地黄寡糖可提高 GK 基因的表达量, 其中以地黄寡糖高剂量最为显著, 使 GK 的表达量上升达 37% ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组大鼠 G-6-Pase 基因表达明显上升 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地黄寡糖可使糖尿病大鼠 G-6-Pase 基因表达量趋于正常, 高剂量的作用较为显著 ($P < 0.05$)。结果见表 4 和图 1。

4 讨论

Besedovsky 等^[9]以神经内分泌系统与免疫系统之间的相互作用及其物质基础为依据, 提出了“神经内分泌免疫网络”(NIM) 学说。NIM 学说认为机体通过神经系统、内分泌系统和免疫系统相互协调, 统一支配全身各功能系统, 维持机体的自稳。本实验室多年来以 NIM 学说为指导, 研究地黄寡糖对糖尿病大鼠糖自稳的调节, 逐渐形成了“激素-糖代谢关键酶-肝糖原”的研究思路。

表 2 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠肝糖原的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of RGO on hepatic glycogen in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	肝糖原 / (mg·g ⁻¹)
对照	—	8	2.63 $\pm$ 0.20
模型	—	11	1.57 $\pm$ 0.34**
地黄寡糖	100	11	1.83 $\pm$ 0.71
	200	11	2.31 $\pm$ 0.33**
二甲双胍	200	11	1.75 $\pm$ 0.28

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

表 3 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠 GK 和 G-6-Pase 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of RGO on activities of GK and G-6-Pase in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	G-6-Pase / (U·g ⁻¹)	GK / (U·g ⁻¹)
对照	—	8	2.02 ± 0.32	1.91 ± 0.36
模型	—	11	2.37 ± 0.60	0.85 ± 0.36**
地黄寡糖	100	10	2.17 ± 0.70	1.02 ± 0.51
	200	11	1.62 ± 0.73 ^{▲▲}	1.43 ± 0.27 ^{▲▲}
二甲双胍	200	11	1.13 ± 0.51 ^{▲▲▲}	1.28 ± 0.43 [▲]

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ ^{▲▲▲} $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ ^{▲▲▲} $P < 0.001$ vs model group表 4 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠 GK 和 G-6-Pase 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effects of ROS on gene expression of GK and G-6-Pase in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	GK		G-6-Pase	
		动物 / 只	基因表达	动物 / 只	基因表达
对照	—	8	0.61 ± 0.19	7	0.51 ± 0.13
模型	—	11	0.43 ± 0.11*	10	0.72 ± 0.16*
地黄寡糖	100	10	0.50 ± 0.21	10	0.64 ± 0.31
	200	10	0.59 ± 0.12 [▲]	10	0.56 ± 0.15 [▲]
二甲双胍	200	9	0.57 ± 0.18	10	0.46 ± 0.18 ^{▲▲}

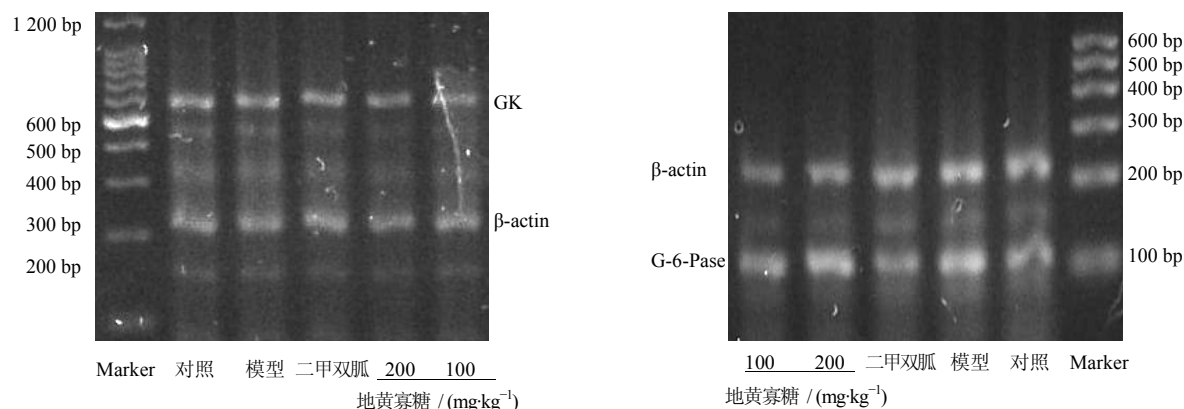
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group

图 1 地黄寡糖对 2 型糖尿病大鼠 GK 和 G-6-Pase 基因表达的影响

Fig. 1 Effects of RGO on gene expression of GK and G-6-Pase in type 2 diabetic rats

本实验结果表明,与模型组相比,地黄寡糖给药组能显著增加肝糖原的量,提高 GK 活性和基因表达量,降低 G-6-Pase 活性和基因表达量。减少肝糖输出是治疗糖尿病的新途径之一,肝糖原分解和糖异生是维持空腹血糖浓度的两条主要的代谢通路。通过抑制糖异生和/或糖原分解过程中关键酶的活性可以抑制肝糖生成同时降低空腹血糖。因此作为控制肝糖输出两大途径的关键酶 G-6-Pase 成为抗高血糖药物的有效靶点之一^[10]。胰岛素缺乏或血糖

过高都诱导 G-6-Pase 基因的表达^[11]。GK 催化葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖,是葡萄糖代谢的第一个限速酶。在 β 细胞中, GK 决定能量介导的葡萄糖诱导胰岛素释放反应的幅度,被称为“胰腺的葡萄糖感受器”,其活性受葡萄糖浓度的调节。在肝细胞中, GK 控制肝细胞对葡萄糖的摄取和利用,其活性则受胰岛素的调节,被称为“代谢信号发生器”^[12]。近年来已经开发出了很多 GK 小分子活化剂作为治疗糖尿病的药物^[13]。地黄寡糖很可能通过影响 GK 和

G-6-Pase 这两个酶活性和基因表达量,才使糖尿病大鼠肝糖原的量增加,减少肝糖输出,最终降低血糖。

综上所述,地黄寡糖显著增加糖尿病大鼠肝糖原的量,减少肝糖输出,对 G-6-Pase 和 GK 活性及基因表达量也有显著影响,由于所测的指标具有局限性,并不能全面反映地黄寡糖对高血糖的改善作用的机制,因此其确切降血糖机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 贺 星,田 红,徐 颂,等. 糖尿病治疗药物的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 129-133.
- [2] 邱建国,张汝学,贾正平,等. HPLC 法测定地黄及含地黄成药中寡糖 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1997-2000.
- [3] 邓 红,王 新,徐 芳,等. 六味地黄汤对糖尿病肾病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1679-1682.
- [4] 曾 艳,贾正平,张汝学,等. 地黄寡糖在 2 型糖尿病大鼠模型上得降血糖作用及机制 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 441-415.
- [5] Zhang R X, Zhou J H, Jia Z P, *et al*. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 90: 39-43.
- [6] 张汝学,周金黄,张永祥,等. 去胸腺对大鼠糖代谢的影响即地黄寡糖对其的调节作用 [J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 194-197.
- [7] 张汝学,贾正平,谢景文,等. 老年大鼠糖代谢变化及地黄寡糖对其的改善作用 [J]. 中国老年学杂志, 2002, 22(5): 408-409.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈 修,等. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [9] Besedovsky H O, Sorkin E. Netwrk of immune-neuroendocrine interaction [J]. *Clin Exp Immunol*, 1977, 27(1): 1-12.
- [10] Moller D E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 821-827.
- [11] Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, 21(4): 587-605.
- [12] 李 丽,杨香玖. 葡萄糖激酶与 III 型糖尿病 [J]. 国外医学: 遗传学分册, 1998. 21(2): 89-91.
- [13] 李永强,冯志强,宋宏锐,等. 葡萄糖激酶及其小分子活化剂研究进展 [J]. 药学报, 2006, 41(5): 390-394.