

尿石素 A 激活自噬改善糖尿病小鼠肝脏胰岛素抵抗研究

田亚丽¹, 张 燕^{2#}, 古丽海夏·哈勒玛合拜¹, 巴合提别克·托合塔尔拜克³, 樊永强⁴, 张炎之^{1*}

1. 新疆医科大学药学院 药理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆军区总医院 儿科, 新疆 乌鲁木齐 830011

3. 新疆医科大学第一附属医院, 省部共建国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

4. 新疆医科大学临床医学“5+3”本硕班, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: **目的** 研究尿石素 A (UA) 对 2 型糖尿病模型小鼠肝脏胰岛素信号通路的影响及与自噬的关系。**方法** 将 C57BL/6 小鼠按体质量随机分成 4 组, 即对照组、模型组、尿石素 A (50 mg/kg) 组、尿石素 A (50 mg/kg) 联合氯喹 (50 mg/kg) 组, 高脂饲料喂养 6 周后, ip 链脲佐菌素 (STZ) 建立 2 型糖尿病模型。各组小鼠 ig 给药 7 周, 检测小鼠体质量、饮水量、血脂、空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS) 水平; 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、胰岛素敏感指数 (ISI); HE 染色观察小鼠肝组织病理变化; 蛋白免疫印迹法检测小鼠肝组织磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、葡萄糖转运蛋白 2 (Glut2)、磷酸化糖原合酶激酶-3 β (p-GSK3 β) 及自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 II/I (LC3 II/I)、选择性自噬接头蛋白 (p62) 表达水平。**结果** 与模型组比较, UA 能够显著改善糖尿病模型小鼠肝组织脂肪变和水肿; 显著降低血浆三酰甘油 (TG)、游离脂肪酸 (FFA)、低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C)、FBG、FINS 水平, 升高高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 水平 ($P < 0.01$); 显著降低 HOMA-IR, 升高 ISI ($P < 0.01$); 上调肝组织 p-Akt、Glut2、p-GSK3 β 、LC3 II/I 蛋白表达, 抑制 p62 蛋白表达 ($P < 0.01$)。联合氯喹后, 小鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 增加, ISI 降低 ($P < 0.05$); 肝组织水肿和脂肪病变明显加重; 肝组织 p-Akt、Glut2、LC3 II/I 蛋白表达水平降低, p62 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), 显示自噬抑制剂氯喹明显削弱了 UA 的作用。**结论** UA 可能是通过激活肝脏自噬改善糖尿病小鼠肝脏胰岛素抵抗。

关键词: 尿石素 A; 糖尿病; 胰岛素抵抗; 胰岛素信号通路; 自噬

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)03-0710-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.022

Urolithin A activates autophagy to improve liver insulin resistance in diabetic mice

TIAN Ya-li¹, ZHANG Yan², Gulihaxia·Halemahebai¹, Bahetibieke·Tuohetaerbaik³, FAN Yong-qiang⁴, ZHANG Yan-zhi¹

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Department of Pediatrics, Xinjiang Military General Hospital, Urumqi 830011, China

3. State Key Laboratory of Local High Incidence, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

4. Clinical Medicine (“5 + 3” Integration) of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of urolithin A (UA) on liver insulin signaling pathway in type 2 diabetes model mice and its relationship with autophagy. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into four groups according to body weight, namely control group, model group, UA (50 mg/kg) group, UA (50 mg/kg) combined with chloroquine (50 mg/kg) group. After 6 weeks of high-fat diet, a type 2 diabetes model was established by ip streptozotocin (STZ). The mice in each group were ig administrated for 7 weeks, and their body weight, water intake, blood lipids, fasting blood glucose (FBG), and fasting insulin (FINS) levels were measured; HE staining was used to observe pathological changes in mouse liver tissue; Western blotting was used to detect mouse phosphorylated protein kinase B (p-Akt), glucose transporter 2 (Glut2), phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β

收稿日期: 2019-09-03

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2017D01C204); 国家自然科学基金资助项目 (81760767); 新疆医科大学博士启动基金 (2019-017); 新疆医科大学研究生创新创业启动基金项目 (CXCY2018006); 新疆自治区研究生科研创新项目 (XJ2019G192)

作者简介: 田亚丽 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。Tel: 17799208521 E-mail: 1446475934@qq.com

***通信作者** 张炎之, 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为代谢性疾病及心血管药理学。E-mail: 1533465971@qq.com

#并列第一作者 张 燕, 女, 副主任医师, 研究方向为代谢性疾病。

(p-GSK3 β) and autophagy-related protein microtubule-related protein 1 light chain 3 II/I (LC3II/I) and selective autophagy linker protein (p62) expression levels. **Results** Compared with the model group, UA significantly improved liver tissue steatosis and edema in diabetic model mice, significantly reduced plasma triacylglycerol, free fatty acids, low-density lipoprotein-cholesterol, FBG, FINS levels, and increased high-density lipoprotein-cholesterol level ($P < 0.01$); UA significantly reduced HOMA-IR and increased ISI ($P < 0.01$), up-regulated the protein expression of p-Akt, Glut2, p-GSK3 β , and LC3II/I in liver tissues, and inhibited the expression of p62 protein ($P < 0.01$). Combined with chloroquine, FBG, FINS, and HOMA-IR in mice were increased, and ISI was decreased ($P < 0.05$); Liver tissue edema and steatosis were significantly aggravated; The expression levels of p-Akt, Glut2, LC3II/I protein in liver tissue were decreased, and p62 protein expression levels were increased ($P < 0.05$), indicating that the autophagy inhibitor chloroquine significantly weakened the effect of UA. **Conclusion** UA may improve liver insulin resistance in diabetic mice by activating liver autophagy.

Key words: urolithin A; diabetes; insulin resistance; insulin signaling pathway; autophagy

糖尿病已经成为危害人类健康的慢性杀手,胰岛素抵抗(IR)被认为是糖尿病发生发展的根本“土壤”内环境^[1]。胰岛素信号分子转导障碍是IR的本质。胰岛素的作用是由复杂的信号网络决定的,胰岛素与细胞膜上胰岛素受体结合后,蛋白激酶B(Akt)磷酸化激活,进一步激活葡萄糖转运载体蛋白(Glut),促进血浆葡萄糖被摄取进入细胞内,从而发挥降低血糖的作用^[2]。摄取进入细胞的葡萄糖还可以通过Akt/糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β)通路的介导合成糖原,进而促进胰岛素降低血糖的作用。

自噬是细胞应激时及时清除受损、衰老的细胞成分的重要生理过程,正常的自噬对于维持细胞稳态内环境有关键作用,微管相关蛋白1轻链3(LC3)是自噬小体产生的关键蛋白,选择性自噬接头蛋白(p62)是自噬后期参与自噬小体降解的重要蛋白,LC3和p62是反映自噬活性的关键标记蛋白^[3]。糖尿病患者存在明显自噬缺陷和IR^[4],有报道指出自噬障碍可以加重IR^[5]。

石榴 *Punica granatum* Linn. 是新疆特色药食两用植物,是维吾尔族用于治疗糖尿病的重要组方药材之一^[6],余甘子 *Phyllanthus emblica* Linn.、五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Hist.、诃子 *Terminalia chebula* Retz. 等传统中药也是治疗糖尿病的常用药物^[7]。鞣花酸是上述药材富含的活性成分之一,现代研究显示鞣花酸在肠道能够被肠道菌群分解为尿石素A(UA)^[8]。UA是迄今为止被证实的唯一能够重启线粒体自噬的天然产物,可通过调节自噬蛋白增加秀丽隐杆线虫寿命,提高哺乳动物肌肉功能^[3],通过增强线粒体功能改善胰岛素敏感性^[9]。但UA是否可通过自噬过程干预胰岛素信号通路从而改善IR仍不清楚。本研究采用高脂饮食与链脲佐菌素(STZ)联合诱导制备2型糖尿病小

鼠模型^[10],并用UA单独及联合自噬抑制剂氯喹干预,观察UA对糖尿病小鼠肝组织胰岛素信号通路的影响及与自噬的关系。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性C57 BL/6小鼠,10周龄,体质量(24 ± 2)g,共40只,购自新疆医科大学动物中心,动物许可证号SYXK(新)2016-0002。

1.2 药品与试剂

UA(批号ZZS17112001,质量分数 $\geq 98\%$)购自甄准生物有限公司;STZ(批号WXBC1125V)购自上海圣翊公司;氯喹(CQ,批号171114,质量分数 $\geq 98\%$)购自中国武汉鼎辉生物化工有限公司;高脂饲料购自南通特洛菲饲料有限公司;三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(FFA),低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、胰岛素试剂盒购自上海SinoBest生物科技有限公司;LC3II/I、p62、磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)、磷酸化Akt(p-Akt)、Glut2、lgG-HRP抗体购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.3 仪器

YP202N电子天平、XS205DU分析天平(上海菁海仪器有限公司);GF-1震动球磨仪(北京格瑞德曼仪器设备有限公司);Multiskan GO 1.01.12酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);Multifuge X3R低温冷冻离心机(乌鲁木齐齐鹏程达商贸有限公司);血糖仪(罗氏诊断产品有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

小鼠适应性饲养3d后,按体质量随机分为对照组、模型组、UA组、UA+CQ组,每组10只,对照组小鼠给予普通饲料喂养,其他各组小鼠给予高脂饲料喂养。6周后,禁食不禁水12h,除对照

组外, 其余各组小鼠 ip STZ (85 mg/kg) 2 次, 每次间隔 3 d, 72 h 后尾尖采血检测空腹血糖 (FBG), 判断标准以 $FBG > 11.1 \text{ mmol/L}$ 为模型制备成功^[10]。成模后, 对照组和模型组小鼠 ig 给予生理盐水 10 mL/kg, UA 组和 UA+CQ 组小鼠 ig 给予 UA 50 mg/kg, 每日给药 1 次, 同时 UA+CQ 组小鼠每 3 天 ip CQ (50 mg/kg) 1 次, 连续干预 7 周。UA 给药剂量根据给药指南^[11]、文献报道^[3]及前期预试验结果确定。

2.2 样本收集

给药结束后, 小鼠禁食不禁水 6 h, 称质量后尾尖取血测定血糖。10%水合氯醛麻醉小鼠, 眼眶静脉丛取血, 于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, -80 °C 冻存备用; 摘取小鼠肝脏, 右上叶 4% 甲醛固定, 其余部分 -80 °C 冻存备用。

2.3 血浆样本指标检测

每周同一时间检测小鼠 FBG。按照试剂盒说明书, 采用直接法测定血浆 HDL-C、LDL-C、FFA 含量, 微量法检测血浆 TG 水平; ELISA 法测定血浆空腹胰岛素 (FINS) 水平, 并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 及胰岛素敏感指数 (ISI)。

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FBG} \times \text{FINS}) / 22.5$$

$$\text{ISI} = 1 / (\text{FBG} \times \text{FINS})$$

2.4 肝组织病理学观察

将 4% 甲醛固定的小鼠肝脏组织样本石蜡包埋, 切片 (厚度 3 μm), 脱蜡, 水洗后行苏木素-伊红 (HE) 染色, 封片后显微镜下观察肝组织形态结构的变化。

2.5 Western blotting 法检测蛋白表达

每组取 3 只小鼠肝脏组织, 冰上裂解后, 提取总蛋白, 测定蛋白含量。取 10 μg 总蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V 恒压电泳约 125 min, 待溴酚蓝到达底板时, 终止电泳。4 °C、100 mA、2.5 h 转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过

夜, 加入 p-Akt (1 : 500)、p-GSK3 β (1 : 500)、Glut2 (1 : 1 000)、LC3II/I (1 : 500)、p62 (1 : 500) 一抗 4 °C 过夜孵育; 山羊抗兔 IgG-HRP (1 : 5 000) 二抗 37 °C 孵育 45 min。ELC 化学发光液显影成像。采用 Image J 图像分析软件分析各目的蛋白表达的灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算各目的蛋白相对表达量。

2.6 统计学处理

所有数据用 SPSS 22.0 软件统计分析和 Prism GraphPad 7 绘图, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行 One Way ANOVA。

3 结果

3.1 UA 对糖尿病模型小鼠体质量的影响

与对照组比较, 模型组、UA 组和 UA+CQ 组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, UA 组小鼠体质量差异不显著。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠体质量在第 3、7 周降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.2 UA 对糖尿病模型小鼠饮水量的影响

与对照组比较, 糖尿病模型小鼠饮水量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, UA 组小鼠饮水量显著降低 ($P < 0.05$)。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠饮水量升高, 但差异不显著, 见表 2。

3.3 UA 对糖尿病模型小鼠 FBG 的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 FBG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, UA 组小鼠 FBG 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠 FBG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 3。

3.4 UA 对糖尿病模型小鼠 FINS、HOMA-IR、ISI 的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 显著升高, ISI 显著降低 ($P < 0.01$)。与

表 1 UA 对糖尿病模型小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of UA on body weight in diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	体质量/g					
			造模前	造模后	给药 1 周	给药 3 周	给药 5 周	给药 7 周
对照	—	10	25.3 $\pm$ 0.9	29.0 $\pm$ 1.6	30.7 $\pm$ 1.7	31.6 $\pm$ 1.3	31.9 $\pm$ 1.2	31.6 $\pm$ 1.6
模型	—	8	24.4 $\pm$ 1.1	30.6 $\pm$ 2.2	27.4 $\pm$ 0.9*	28.2 $\pm$ 1.0*	28.5 $\pm$ 1.3*	28.6 $\pm$ 1.2*
UA	50	10	25.0 $\pm$ 1.2	30.3 $\pm$ 1.1	27.9 $\pm$ 1.8*	29.1 $\pm$ 1.9*	28.7 $\pm$ 1.8*	28.6 $\pm$ 1.9*
UA+CQ	50+50	8	24.3 $\pm$ 1.0	30.0 $\pm$ 1.5	26.5 $\pm$ 1.0*	26.9 $\pm$ 1.3*** Δ	26.0 $\pm$ 1.7**	26.6 $\pm$ 0.9*** Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.05$; 与 UA 组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs UA group

表 2 UA 对糖尿病模型小鼠饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of UA on drinking water in diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	饮水量/mL			
			给药 1 周	给药 3 周	给药 5 周	给药 7 周
对照	—	10	6.6±0.6	7.5±2.1	7.7±0.4	7.4±0.4
模型	—	8	18.2±5.0**	16.6±2.5**	17.9±2.1**	17.6±2.1**
UA	50	10	11.0±0.4##	12.3±3.2#	11.6±2.6##	10.6±2.6##
UA+CQ	50+50	8	12.5±4.8	13.8±1.7	12.5±0.7	11.9±0.7

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表 3 UA 对糖尿病模型小鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of UA on fasting blood glucose in diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	FBG/(mmol·L ⁻¹)					
			造模前	造模后	给药 1 周	给药 3 周	给药 5 周	给药 7 周
对照	—	10	7.2±0.4	7.1±0.3	7.8±0.4	7.6±0.3	7.3±0.1	7.5±0.3
模型	—	8	7.6±0.2	9.6±0.4*	20.6±0.5**	26.3±3.6**	24.8±0.7**	22.7±5.6**
UA	50	10	7.1±0.3	9.7±0.4	15.6±4.5##	20.8±4.2#	19.8±1.7##	16.5±6.3#
UA+CQ	50+50	8	7.0±0.2	9.9±0.3	22.7±2.3 [△]	26.8±2.6 [△]	24.6±2.7 [△]	25.2±2.7 ^{△△}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 UA 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下表同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs UA group, same as below tables

模型组比较, UA 组小鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), ISI 显著升高 ($P < 0.01$)。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠 FINS、HOMA-IR 显著升高, ISI 显著降低 ($P < 0.01$), 见表 4。

3.5 UA 对糖尿病模型小鼠血脂的影响

与对照组比较, 模型组小鼠血浆 TG、FFA、

LDL-C 水平显著增加, HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, UA 组小鼠 FFA、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$), TG 水平降低但差异不显著。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠 TG 水平显著降低 ($P < 0.01$), FFA、LDL-C、HDL-C 水平差异不显著, 见表 5。

表 4 UA 对糖尿病模型小鼠 FINS、ISI 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effects of UA on FINS and ISI in diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(ng·mL ⁻¹)	HOMA-IR	ISI
对照	—	10	7.08±0.13	3.88±0.75	1.22±0.23	0.037 0±0.006 3
模型	—	8	25.23±5.50**	10.85±1.87**	12.15±3.63**	0.003 9±0.000 9**
UA	50	10	14.69±6.04#	8.92±1.32##	5.78±2.37##	0.008 9±0.003 8##
UA+CQ	50+50	8	24.37±2.90	9.40±0.88 ^{△△}	10.14±1.28 ^{△△}	0.004 4±0.000 53 ^{△△}

表 5 UA 对糖尿病模型小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effects of UA on blood lipids in diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	TG/(mg·L ⁻¹)	FFA/(μmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	7.63±8.00	532.20±16.10	2.39±0.38	1.36±0.13
模型	—	8	12.33±0.53**	802.00±34.72**	3.62±0.39**	0.76±0.12**
UA	50	10	11.77±1.21	671.30±17.25##	2.99±0.27##	0.94±0.08#
UA+CQ	50+50	8	10.39±0.92 ^{△△}	708.50±25.91	3.19±0.27	0.96±0.15

3.6 UA 对糖尿病模型小鼠肝组织病理学的影响

对照组小鼠肝组织肝小叶结构完整, 无脂肪变和水肿。与对照组比较, 模型组小鼠肝组织脂肪变显著增加, 水肿加重。与模型组比较, UA 组小鼠肝组织脂肪变和水肿显著减轻。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠肝组织脂肪变加重, 水肿加重, 见图 1。

3.7 UA 对糖尿病模型小鼠肝脏 p-Akt、Glut2、p-GSK3 β 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 p-Akt 和 p-GSK3 β 、Glut2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, UA 组小鼠肝组织 p-Akt、Glut2、p-GSK3 β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠肝组织 p-Akt、Glut2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 2。

3.8 UA 对糖尿病模型小鼠肝组织自噬蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 LC3II/I、p62

蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, UA 组小鼠肝组织 LC3II/I 蛋白表达水平显著升高, p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 UA 组比较, UA+CQ 组小鼠肝组织 LC3II/I 蛋白表达水平显著降低, p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 见图 3。

4 讨论

脂质代谢紊乱, 肝脂质异位沉积是促进并加重 IR 的关键因素, 改善 IR 微环境是治疗糖尿病的关键措施^[12]。本实验结果显示高脂联合 STZ 诱导的 2 型糖尿病模型小鼠高血糖伴有高胰岛素血症, 血脂代谢谱出现紊乱, 肝脏具有明显脂肪病变和严重水肿, 肝脏病变结果与高脂果糖诱导的糖尿病大鼠模型研究结果一致^[13]。UA 能够显著降低糖尿病小鼠 FBG 和 FINS 水平, 降低 HOMA-IR, 升高 ISI, 还具有调血脂作用, 明显改善肝脂肪变和水肿。而联用 CQ 后逆转了 UA 改善 FBG 和 IR 的作用, 小鼠肝脏

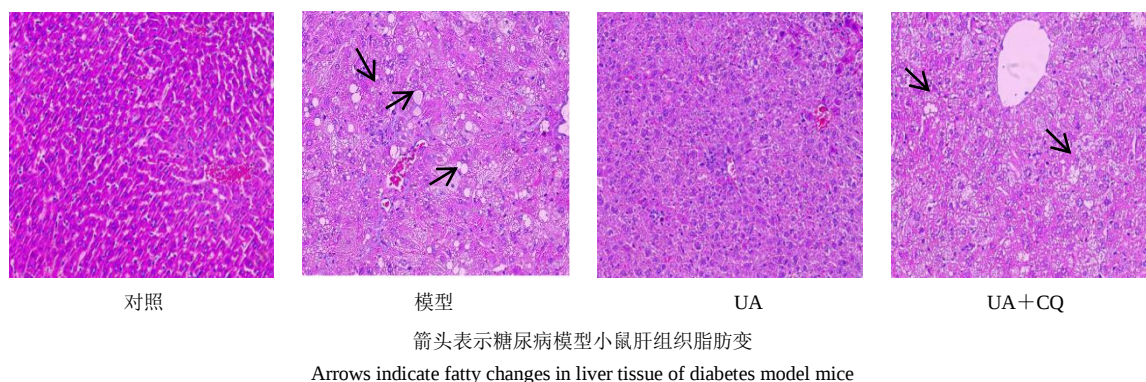
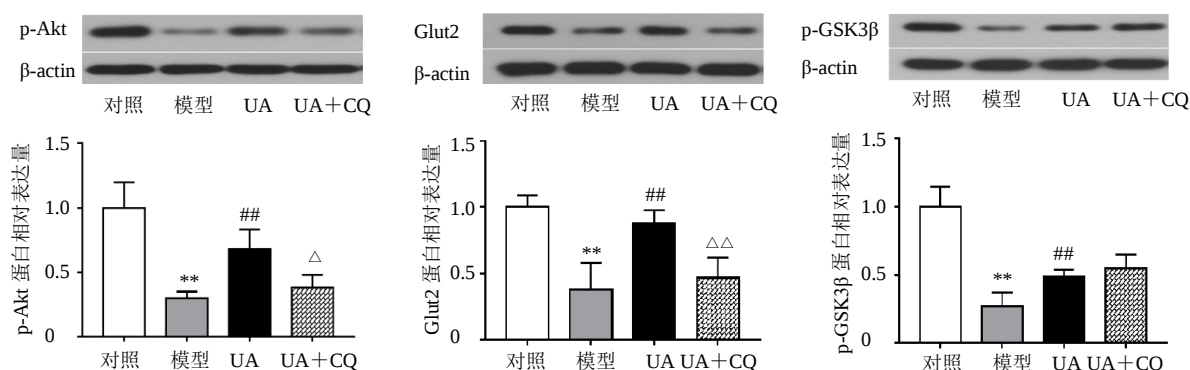


图 1 UA 对糖尿病模型小鼠肝组织病理学改变的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effects of UA on liver histopathology of diabetic model mice (HE, $\times 200$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 UA 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 下图同
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs UA group, same as below figures

图 2 UA 对糖尿病模型小鼠肝脏胰岛素信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of UA on hepatic insulin signaling pathway protein expression of diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

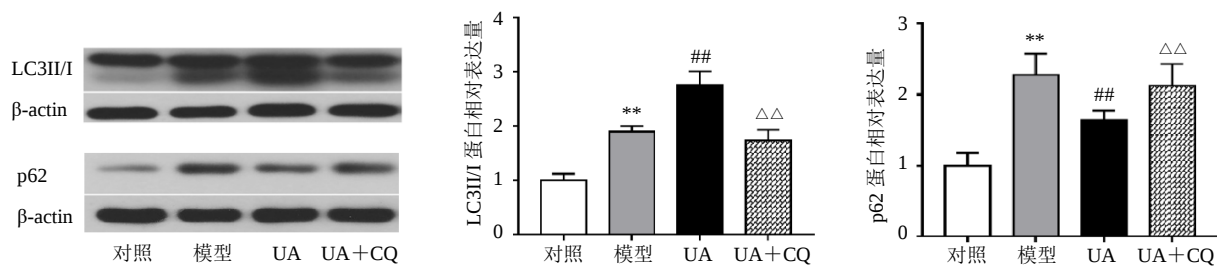


图 3 UA 对糖尿病模型小鼠肝组织自噬蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effects of UA on expression of autophagy protein in liver tissue of diabetic model mice ($\bar{x} \pm s$)

病理状态也接近模型组，显示自噬抑制剂削弱了 UA 对肝脏的保护作用。

肝脏是胰岛素重要的靶器官之一，胰岛素与肝细胞上胰岛素受体结合后，经胰岛素受体底物介导，Akt 以磷酸化形式被活化，p-Akt 主要通过上调 Glut2 的表达和促进 Glut2 向细胞膜的分布，从而促进血浆葡萄糖被摄取进入肝细胞，进而降低血糖^[14]。IR 在分子水平主要表现为上述胰岛素信号通路被抑制^[15]，而胰岛素信号通路的激活具有改善 IR 的作用^[16]。本研究结果显示糖尿病模型小鼠肝组织胰岛素信号通路 Akt/Glut2 被抑制，而 UA 促进了 Akt 磷酸化和 Glut2 蛋白的表达，提示 UA 激活了胰岛素信号通路，促进葡萄糖转运入肝细胞，显示出改善 ISI 的作用。GSK3β 为胰岛素信号分支通路中的一个重要蛋白，激活的 Akt 也可通过促进 GSK3β 磷酸化，促进摄取入细胞内的葡萄糖合成糖原进行储存^[17-18]。糖尿病模型小鼠肝组织 GSK3β 磷酸化水平降低，而 UA 上调了 GSK3β 的磷酸化水平，提示 UA 还有促进肝糖原合成进而改善 IR 的作用。

自噬正常与否与 IR 发生有密切关系^[19]。有研究表明肥胖小鼠肝脏的自噬被抑制，导致肝脏的 ISI 降低^[20]。自噬缺陷的 H9c2 细胞模型中，自噬水平的降低也会导致 IR^[21]。正常的自噬可以清除应激状态下肝细胞中堆积的脂滴，降低脂毒性，并改善肝细胞 ISI^[22]。LC3I 分布于胞浆中，当自噬体形成后 LC3II 定位于自噬体内、外膜上直至自噬小体与溶酶体融合并将其降解，因此 LC3II 与 LC3I 的比值反映了自噬小体形成的数量，也是自噬延伸阶段的重要标志^[23]。p62 作为一种支架蛋白及选择性自噬降解底物参与自噬过程^[24]。本研究显示 2 型糖尿病模型小鼠肝脏 LC3-II/I 和 p62 蛋白表达均上调，显示自噬被激活但自噬流障碍，UA 干预一定程度上纠正了这种不正常自噬状态，使 LC3-II/I 上调，p62

表达下调，显示自噬流畅通。本实验采用自噬抑制剂 CQ 联合 UA 给药，CQ 主要抑制自噬后期自噬体与溶酶体融合阶段，使自噬体降解受抑制，联合 CQ 后 UA 上调 p-Akt、Glut2 的作用被明显削弱，提示 UA 改善胰岛素信号传导作用可能是通过改善肝细胞自噬流障碍。同时观察到联合 CQ 后没有明显削弱 UA 上调 GSK3β 磷酸化水平的作用，提示 CQ 抑制自噬过程对糖原合成过程可能影响较小。

本研究结果表明，UA 可显著改善糖尿病模型小鼠肝脏 IR，推测其机制可能是通过改善肝脏自噬障碍从而增强胰岛素信号通路的传导，深入的分子机制需要进一步研究。UA 是植物多酚鞣花酸经肠道菌群代谢的天然活性产物^[25]，临床试验显示 UA 能够通过提升线粒体的功能来减缓老年人骨骼肌的衰老^[26]。以上结果表明 UA 可作为糖尿病治疗的潜在活性物质，值得进一步研究开发。

参考文献

- [1] Al-Sulaiti H, Diboun I, Banu S, et al. Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals [J]. *J Transl Med*, 2018, doi: 10.1186/s12967-018-1548-x.
- [2] Bian C, Bai B, Gao Q, et al. 17β-Estradiol regulates glucose metabolism and insulin secretion in rat islet β cells through GPER and Akt/mTOR/GLUT2 pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00531.
- [3] Ryu D, Mouchiroud L, Andreux P A, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents [J]. *Nat Med*, 2016, doi: 10.1038/nm.4132.
- [4] Codogno P, Meijer A J. Autophagy: A potential link between obesity and insulin resistance [J]. *Cell Metabol*, 2010, 11(6): 449-451.
- [5] Frendo-Cumbo S, Jaldin-Fincati J R, Coyaud E, et al. Deficiency of the autophagy gene ATG16L1 induces

- insulin resistance through KLHL9/KLHL13/CUL3-mediated IRS1 degradation [J]. *J Biol Chem*, 2019, doi: 10.1074/jbc.RA119.009110.
- [6] Saleem B, Samer S, Ziyad A. Pomegranate and type 2 diabetes [J]. *Nut Res*, 2013, 33(5): 341-348.
- [7] D'souza J J, D'souza P P, Fazal F, et al. Anti-diabetic effects of the Indian indigenous fruit *Emblica officinalis* Gaertn: Active constituents and modes of action [J]. *Food Funct*, 2014, 5(4): 635-644.
- [8] Dahiya N R, Chandrasekaran B, Kolluru V, et al. A natural molecule, urolithin A, downregulates androgen receptor activation and suppresses growth of prostate cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(10): 1332-1341.
- [9] Toney A M, Fan R, Xian Y, et al. Urolithin A, a gut metabolite, improves insulin sensitivity through augmentation of mitochondrial function and biogenesis [J]. *Obesity*, 2019, 27(4): 612-620.
- [10] Xie K J, Huang L, Qu X H, et al. Effects of AdipoRon orally on the functions of spleen and pancreas in type 2 diabetic mice [J]. *J Appl Physiol*, 2019, 35(1): 60-64.
- [11] Administration F D. Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers [DB/OL]. 2005-06-07. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>.
- [12] Petersen M C, Shulman G I. Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance [J]. *Trend Pharmacol Sci*, 2017, 38(7): 649-665.
- [13] Amin M M, Arbid M S. Estimation of ellagic acid and/or repaglinide effects on insulin signaling, oxidative stress, and inflammatory mediators of liver, pancreas, adipose tissue, and brain in insulin resistant/type 2 diabetic rats [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42(2): 181-192.
- [14] LI B, Fang J, He T, et al. Resistin up-regulates LPL expression through the PPAR γ -dependent PI3K/AKT signaling pathway impacting lipid accumulation in RAW264.7 macrophages [J]. *Cytokine*, 2019, doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.016.
- [15] Pitaloka D M I, Ko C H, Lin M T, et al. Glutamine administration promotes hepatic glucose homeostasis through regulating the PI3K/Akt pathway in high-fat diet-induced obese mice with limb ischemia [J]. *Nutr Res*, 2019, doi: 10.1016/j.nutres.2019.05.008.
- [16] Chen L, Wei X, Hou Y, et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis through PI3K/Akt/GSK3 β pathway in rats [J]. *Neurochem Int*, 2014, doi: 10.1016/j.neuint.2014.01.006.
- [17] White M F. IRS proteins and the common path to diabetes [J]. *Am J Physiol-Endo M*, 2002, 283(3): E413-422.
- [18] Zhu M, Li J, Wang K, et al. Isoquercitrin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis of EA. hy926 cells via the PI3K/Akt/GSK3 signaling pathway [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 356-370.
- [19] Guo Q, Xu L, Li H, et al. Progranulin causes adipose insulin resistance via increased autophagy resulting from activated oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 51-59.
- [20] Qian Q, Zhang Z, Orwig A, et al. Nitrosoglutathione reductase dysfunction contributes to obesity-associated hepatic insulin resistance via regulating autophagy [J]. *Diabetes*, 2018, 67(2): 193-207.
- [21] Chan Y K, Sung H K, Jahng J W, et al. Lipocalin-2 inhibits autophagy and induces insulin resistance in H9c2 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, doi: 10.1016/j.mce.2016.04.006.
- [22] Zhou S, Zhang M, Zhu M. Liraglutide reduces lipid accumulation in steatotic L-02 cells by enhancing autophagy [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2351-2357.
- [23] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545.
- [24] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor [J]. *FEBS J*, 2015, 282(24): 4672-4678.
- [25] 陈 鹏, 涂晶晶, 李巧玲, 等. 肠道菌群对石榴皮鞣质的分解代谢作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(14): 3396-3402.
- [26] Pénelope A A, William B, Dongryeol R, et al. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans [J]. *Nat Metabol*, 2019, doi: 10.1038/s42255-019-0073-4.