

双清平化方对代谢综合征大鼠骨骼肌自噬通路蛋白表达的影响

付文浩^{1,2}, 田春雨¹, 喇孝瑾¹, 张国伟¹, 张敏¹, 王瑶瑶¹, 陈瑞军¹, 王秀萍³, 李继安^{1*}

1. 华北理工大学中医学院 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210

2. 涉县中医院, 河北 邯郸 056400

3. 河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 观察双清平化方对代谢综合征大鼠 Lee's 指数、血糖、血脂及骨骼肌哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、自噬效应蛋白 1 (Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3) 蛋白表达的影响, 探讨其改善糖脂代谢的作用机制。方法 大鼠给予高脂饲料加 10%果糖水溶液喂养, 并联合应用 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯 (*N*-nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME) 及链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导代谢综合征模型。代谢综合征大鼠给予双清平化方或二甲双胍干预 8 周, 实验前后定期测量大鼠体质量、体长、腹围、血压、糖耐量、糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, GHb)、胰岛素 (insulin, INS)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C), 计算葡萄糖曲线下面积 (OGTT-AUC) 和胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察骨骼肌组织病理形态学变化; 采用 Masson 染色观察骨骼肌纤维形态变化; 采用免疫组化法检测骨骼肌组织中 LC3 蛋白表达; 采用 Western blotting 检测骨骼肌组织中 mTOR、Beclin1 和 LC3 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、餐后 2 h 血糖 (2 h postprandial glucose, PG2h)、OGTT-AUC、HOMA-IR、INS、GHb、TC、TG 及 LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 骨骼肌组织中 mTOR 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), Beclin1、LC3 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 双清平化方组 FBG、PG2h、OGTT-AUC、HOMA-IR、INS、GHb、TC、TG 及 LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$); 骨骼肌组织中 mTOR 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$), Beclin1 和 LC3 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。结论 双清平化方可以改善代谢综合征大鼠胰岛素抵抗, 改善糖脂代谢水平, 抑制骨骼肌病理变化, 其作用机制可能与调节骨骼肌自噬, 激活骨骼肌组织自噬通路中 mTOR、Beclin1、LC3 蛋白表达有关。

关键词: 双清平化方; 代谢综合征; 骨骼肌; 自噬; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6108-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.017

Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on autophagy pathway protein expressions in skeletal muscle of rats with metabolic syndrome

FU Wen-hao^{1, 2}, TIAN Chun-yu¹, LA Xiao-jin¹, ZHANG Guo-wei¹, ZHANG Min¹, WANG Yao-yao¹, CHEN Rui-jun¹, WANG Xiu-ping³, LI Ji-an¹

1. Hebei Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Diabetes and Its Complications, Traditional Chinese Medicine College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. Shexian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Handan 056400, China

3. Institute of Coastal Agriculture, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To observe the effects of Shuangqing Pinghua Recipe (双清平化方, SPR) on Lee's index, blood glucose, blood lipids and mammalian target of rapamycin (mTOR), Beclin1 and microtubule-associated protein1 light chain 3 (LC3) protein

收稿日期: 2022-04-28

基金项目: 科技部对发展中国家常规性科技援助项目 (KY201904005); 唐山市糖尿病中西医结合防治团队 (19130205C)

作者简介: 付文浩 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治代谢综合征。Tel: 15369076939 E-mail: begoodful@163.com

*通信作者: 李继安, 博士生导师, 教授, 主要从事内分泌、糖脂代谢研究。E-mail: lnyy@vip.sina.com

expressions in skeletal muscle of rats with metabolic syndrome, and explore the mechanism of SPR on improving glucose and lipid metabolism. **Methods** A high-fat diet with 10% fructose water was fed and combined with the application of *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME) and streptozotocin (STZ) to induce metabolic syndrome model. Rats with metabolic syndrome were treated with SPR or metformin for 8 weeks, rats were periodically tested for body weight, body length, abdominal circumference, blood pressure and glucose tolerance, glycosylated hemoglobin (GHb), insulin (INS), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and area under the glucose curve (OGTT-AUC) and insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of skeletal muscle tissue; Masson staining was used to observe the morphological changes of skeletal muscle fibers; Immunohistochemistry was used to detect the expression of LC3 protein in skeletal muscle tissue; Western blotting was used to detect mTOR, Beclin1 and LC3 protein expressions in skeletal muscle tissue. **Results** Compared with control group, fasting blood glucose (FBG), 2 h postprandial glucose (PG2h), OGTT-AUC, HOMA-IR, INS, GHb, TC, TG and LDL-C levels were significantly increased ($P < 0.01$), HDL-C level was significantly decreased ($P < 0.01$) in model group, mTOR protein expression in skeletal muscle tissues was significantly up-regulated ($P < 0.01$), Beclin1 and LC3 protein expressions were significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, FBG, PG2h, OGTT-AUC, HOMA-IR, INS, GHb, TC, TG and LDL-C levels in SPR group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), HDL-C level was significantly increased ($P < 0.01$), mTOR protein expression in skeletal muscle was significantly up-regulated ($P < 0.01$), Beclin1 and LC3 protein expressions were significantly down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** SPR can improve insulin resistance, improve glucose and lipid metabolism, and inhibit the pathological changes of skeletal muscle in rats with metabolic syndrome. Its mechanism may be related to regulating skeletal muscle autophagy and activating mTOR, Beclin1 and LC3 protein expressions.

Key words: Shuangqing Pinghua Recipe; metabolic syndrome; skeletal muscle; autophagy; insulin resistance

代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 是肥胖并伴有高血压及糖、脂代谢异常症候群, 是心脑血管病的主要危险因素^[1-3]。目前, 我国老年人群中 MS 患病率已达 25.5%, 预计到 2035 年成人 MS 患病率可达 35%~50%^[4-5]。因此, 预防和治疗 MS 已成为医学研究的热点。胰岛素抵抗是 MS 发病的重要病理基础, 而骨骼肌是胰岛素抵抗的重要靶组织。研究显示自噬与胰岛素抵抗密切相关, 并参与了胰岛素抵抗的发生与进展。

现代医学的治疗方案尚停留在对症治疗以及延缓疾病进展的阶段, 纠正代谢紊乱是治疗 MS 的研究方向。根据临床 MS 病证分析, 肝胃火旺、痰浊不化为其常见病证, 本课题组依据临床经验和药理实验总结出防治该证的双清平化方^[6]。推测是否通过调节骨骼肌自噬, 进而改善骨骼肌能量的稳态及胰岛素抵抗。为此, 本实验构建 MS 大鼠模型, 以不同剂量双清平化方进行干预, 观察其对模型大鼠 Lee's 指数、血压、血糖、血脂、糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, GHb)、胰岛素 (insulin, INS)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 的影响及骨骼肌组织病理形态学、骨骼肌

组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、自噬效应蛋白 1 (Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3) 蛋白表达的变化, 探讨双清平化方改善 MS 大鼠糖脂代谢的作用机制, 为其治疗 MS 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 4 周龄, 体质量 (146.1±2.6) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0008, 合格证号 1103221911004286。饲养于华北理工大学 10000 级屏障环境动物实验室, 实验设施合格证编号 SYXK (冀) 2020-007, 室温 22~24 °C, 相对湿度 45%, 光暗周期 (12 h/12 h)。动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会审批 (批准号 LAEC-NCST-2020156)。

1.2 药材

双清平化方组成为桑叶、蒲公英、生山楂、决明子、莱菔子、夏枯草、葛根、海藻粉、炒荞麦粉、珍珠粉。蒲公英购自河北省农林科学院滨海农业研究所, 其余药材均购自于唐山市北京同仁堂药店, 经华北理工大学田春雨教授鉴定桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 蒲公英为菊科植物碱地蒲公英 *Taraxacum borealisinense* Kitam. 的干燥全草,

生山楂为蔷薇科植物山楂 *Crateagus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 决明子为豆科植物决明 *Cassia tora* L. 的干燥成熟种子, 莱菔子为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子, 夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗, 葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobate* (Wild.) Ohwi 的干燥根, 海藻为马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Tum.) C. Ag. 的干燥藻体, 炒荞麦为蓼科植物荞麦 *Fagopyrum esculentum* Moench. 的干燥成熟种子, 珍珠粉为珍珠贝科动物马氏珍珠贝 *Pteria martensii* (Dunker) 受刺激形成的珍珠粉末。

1.3 药品与试剂

普通饲料[豫饲证(2008)25540]购自北京环宇中科生物科技有限公司; 高脂饲料(批号 SN10141) 购自赛诺生物科技有限公司; 对照品绿原酸(批号 110753-202018)、咖啡酸(批号 110885-201703)、菊苣酸(批号 111752-202104)、葛根素(批号 110752-201816)均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均为 98%; 盐酸二甲双胍片(批号 190401)购自中美上海施贵宝制药有限公司; 组织固定液(批号 MA0192)购自大连美仑生物科技有限公司; GHb 试剂盒(批号 20191008)、INS 试剂盒(批号 H203-1-2)、TC 试剂盒(批号: 20190930)、TG 试剂盒(批号 20190929)、LDL-C 试剂盒(批号 20190929)、HDL-C 试剂盒(批号 20190930)均购自南京建成生物工程研究所; *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(*N*-nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME, 批号 A7088-25)购自 APE BIO Technology LLC 公司; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 批号 BJBAG2001)购自北京博爱港生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号 A91041)购自杭州联科生物技术股份有限公司; 快速十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(批号 ZD304)购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; β -actin 抗体(批号 9100026001)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; mTOR 抗体(批号 20657-1-AP)、Beclin1 抗体(批号 11306-1-AP)、LC3 抗体(批号 14600-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 10226187)购自美国 Seracare 公司。

1.4 仪器

10H55IH1538 型稳益血糖仪(三诺生物传感股份有限公司); TP1020 型组织脱水机、RM2245 型组织切片机(德国 Leica 公司); 电泳仪、成像系统

ChemiDocTM CXRS+System(美国 Bio-Rad 公司); M200PR0 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 正置显微镜(日本 Olympus 公司); LC-20A 型液相色谱仪(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 双清平化方的制备

取桑叶 10 g、蒲公英 30 g、生山楂 20 g、决明子 10 g、莱菔子 10 g、夏枯草 20 g、葛根 20 g、海藻粉 3 g、炒荞麦粉 30 g、珍珠粉 1 g, 打成粗末, 加 6 倍量的水浸泡 1 h 后, 煎煮 1.5 h, 滤过, 药渣再加入 4 倍量的水煎煮 1.5 h, 滤过, 混合 2 次水煎液, 低温高速离心 2 h, 取上清液, 于 100 °C 的水浴锅中浓缩。经高效液相色谱检测, 主要含葛根素 0.30%、绿原酸 0.034%、咖啡酸 0.0096% 和菊苣酸 0.065%。

2.2 造模、分组及给药

60 只雄性 SD 大鼠给予普通饲料适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组(10 只)和造模组(50 只), 对照组给予普通饲料及纯水, 造模组给予高脂饲料及 10%果糖水溶液喂养, 饲养至第 11 周实验组大鼠 ig *L*-NAME (20 mg/kg) 2 周, 并于第 13 周 ip STZ (30 mg/kg), 对照组 ig 等体积生理盐水并 ip 枸橼酸钠缓冲液。实验第 8、12、14 周测量各组大鼠体长、体质量、腹围, 并根据公式计算 Lee's 指数^[7]; 实验第 0、4、8、12、14 周测量各组大鼠血压。第 14 周评估成模情况^[7-8], 评价指标为①中心性肥胖: Lee's 指数或体质量及腰围显著变化; ②高血压: 收缩压或舒张压显著变化; ③高血糖: 11.1 mmol/L <空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) <16.7 mmol/L 或餐后 2 h 血糖(2 h postprandial glucose, PG2h) >16.7 mmol/L。

将成模大鼠按血糖随机分为模型组、二甲双胍(0.18 g/kg)组和双清平化方低、中、高剂量(3.47、6.93、13.38 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍)组, 每组各 10 只^[9]。各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 8 周。

2.3 血清学检测

药物干预前及干预第 4、8 周末尾静脉采血, 检测大鼠 FBG 及 PG2h; 计算葡萄糖曲线下面积(OGTT-AUC)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。于药物干预第 8 周末, ip 10%水合氯醛-氨基甲酸乙酯(1 mL/kg)^[10], 腹主动脉采血, 离心后取血清, 根据试剂盒说明书进行相应指标的检测。

2.4 骨骼肌组织病理变化观察

采血后立即取大鼠双侧后肢腓肠肌, 于 4%多

聚甲醛中固定，固定完成后进行脱水、包埋、切片以及脱蜡，按苏木素-伊红(HE)染液试剂盒说明书进行HE常规染色，观察骨骼肌组织形态学变化；按Masson染液试剂盒说明书进行Masson染色，观察骨骼肌组织纤维变化。

2.5 免疫组化检测骨骼肌组织中LC3蛋白表达

取“2.4”项下脱蜡后的切片进行抗原修复，内源性过氧化氢酶阻断，滴加山羊血清封闭，滴加LC3抗体(1:500)，4℃孵育过夜，滴加生物素标记山羊抗兔IgG聚合物，滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，DAB显色，流水冲洗，苏木素染色，流水冲洗，1%盐酸乙醇分化液分化，梯度脱水，二甲苯透明，封片，于显微镜下观察。

2.6 Western blotting 检测骨骼肌组织中mTOR、Beclin1和LC3蛋白表达

各组大鼠骨骼肌组织剪碎后，放入含蛋白酶抑制剂的裂解液，匀浆提取蛋白，采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，蛋白样品经10%SDS-PAGE凝胶电泳，转至PVDF膜，于5%脱脂牛奶中封闭2h，分别加入mTOR(1:1000)、p-mTOR(1:1000)、Beclin1(1:2000)、LC3(1:1000)抗体，4℃孵育过夜，TBST洗涤，加入山羊抗兔二抗(1:5000)，摇床孵育2h，TBST洗涤，进行凝胶成像分析。

2.7 统计学方法

结果采用Graphpad prism 8.0软件进行分析，采

用单因素方差分析进行多组间比较，先进行方差齐性检验，方差齐进行两两比较，若方差不齐则采用Brown-Forsythe和Welch方差分析。

3 结果

3.1 MS大鼠成模体长、体质量、腹围、Lee's指数和血压测定

如图1所示，大鼠饲养4周后体长、体质量、腹围及Lee's指数均呈现出增长趋势，饲养8周后模型组大鼠体质量、腹围、Lee's指数与对照组相比均具有统计学差异($P < 0.05$)，饲养12、14周后模型组大鼠体长与对照组相比具有统计学差异($P < 0.05$)，模型组大鼠在造模阶段收缩压和舒张压从12周开始至14周明显升高($P < 0.01$)。

3.2 双清平化方对MS大鼠FBG和PG2h的影响

如图2所示，与对照组比较，模型组大鼠FBG和PG2h均显著升高($P < 0.01$)；与模型组比较，给药4周后，二甲双胍组和双清平化方高剂量组大鼠FBG显著降低($P < 0.01$)，二甲双胍组和双清平化方中、高剂量组PG2h显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)；给药8周后，二甲双胍组和双清平化方中、高剂量组FBG和PG2h均明显降低($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 双清平化方对MS大鼠OGTT-AUC、INS、HOMA-IR及GHb的影响

如图3所示，与对照组比较，模型组大鼠OGTT-AUC、INS、HOMA-IR和GHb均明显升高($P <$

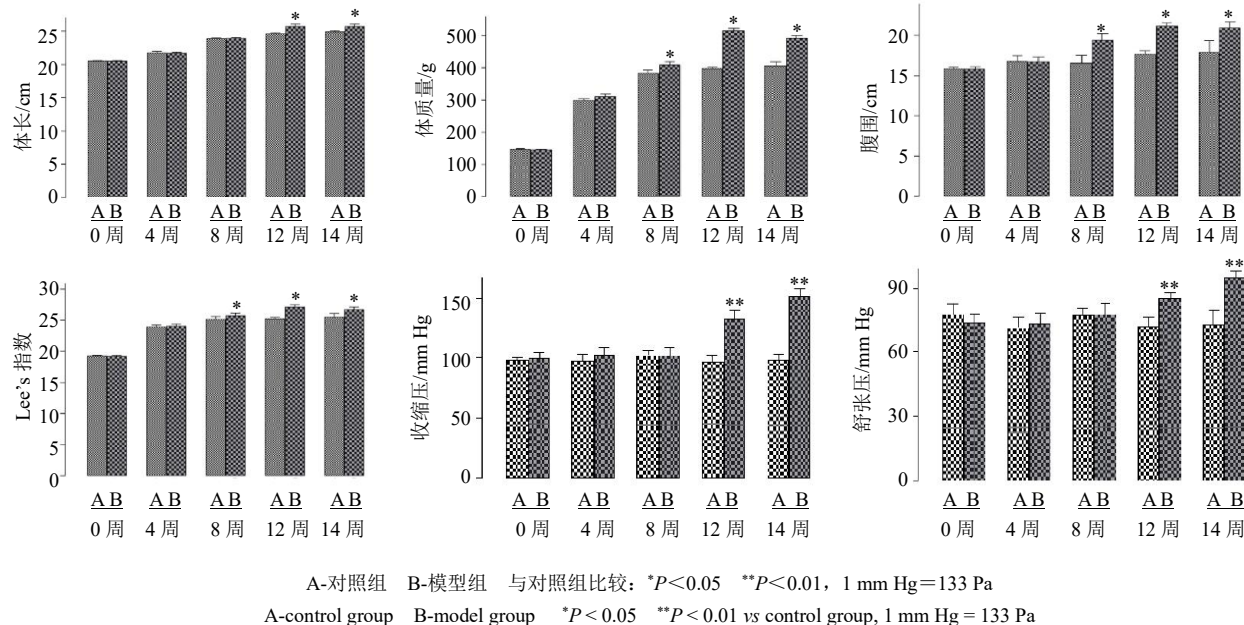
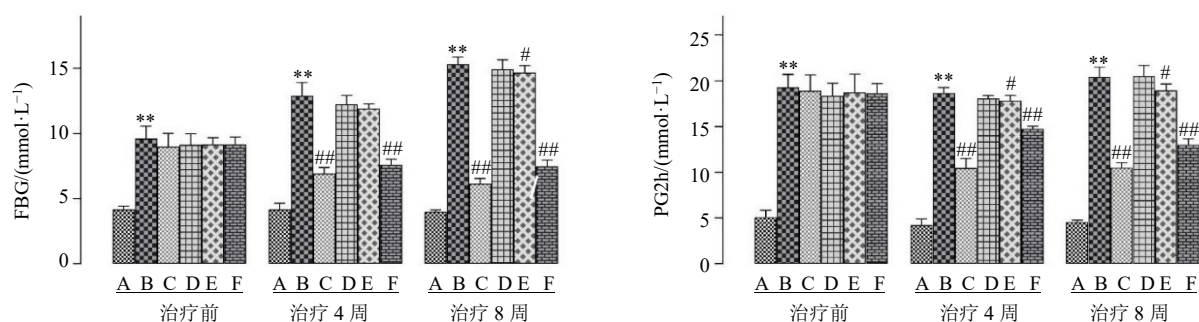


图1 MS大鼠成模体长、体质量、腹围、Lee's指数及血压($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Body length, body weight, abdominal circumference, Lee's index and blood pressure of MS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



A-对照组 B-模型组 C-二甲双胍组 D-双清平化方低剂量组 E-双清平化方中剂量组 F-双清平化方高剂量组 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

A-control group B-model group C-metformin group D-Shuangqing Pinghua Recipe low-dose group E-Shuangqing Pinghua Recipe medium-dose group F-Shuangqing Pinghua Recipe high-dose group ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图2 双清平化方对MS大鼠FBG和PG2h的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on FBG and PG2h in MS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

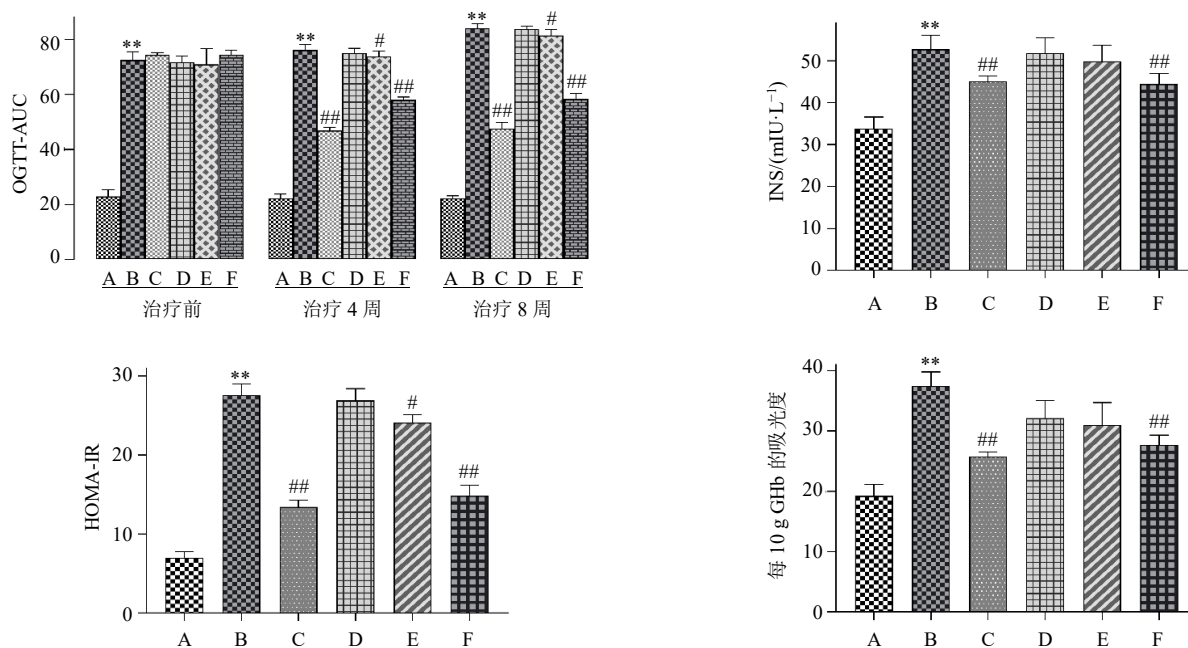


图3 双清平化方对MS大鼠OGTT-AUC、INS、HOMA-IR及GHb的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on OGTT-AUC, INS, HOMA-IR and GHb in MS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

0.01); 与模型组比较, 给药4周后, 二甲双胍组和双清平化方中、高剂量组OGTT-AUC明显下降 ($P < 0.05, 0.01$); 给药8周后, 二甲双胍组和双清平化方中、高剂量组OGTT-AUC和HOMA-IR明显下降 ($P < 0.05, 0.01$), 二甲双胍组和双清平化方高剂量组INS和GHb均明显下降 ($P < 0.01$)。

3.4 双清平化方对MS大鼠血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C水平的影响

如图4所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中HDL-C水平显著降低 ($P < 0.01$), TC、TG和LDL-

C水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中HDL-C水平显著升高 ($P < 0.01$), TC、TG和LDL-C水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 双清平化方对MS大鼠骨骼肌组织病理变化的影响

如图5所示, 腓肠肌HE染色后, 光镜下可见细胞核为蓝色, 细胞质、肌纤维、胶原纤维和红细胞呈深浅不一的红色。对照组大鼠骨骼肌肌纤维排列整齐、胞质均匀, 细胞核排列正常、形态规则; 模型组大鼠骨骼肌肌纤维排列疏松紊乱, 胞质不匀,

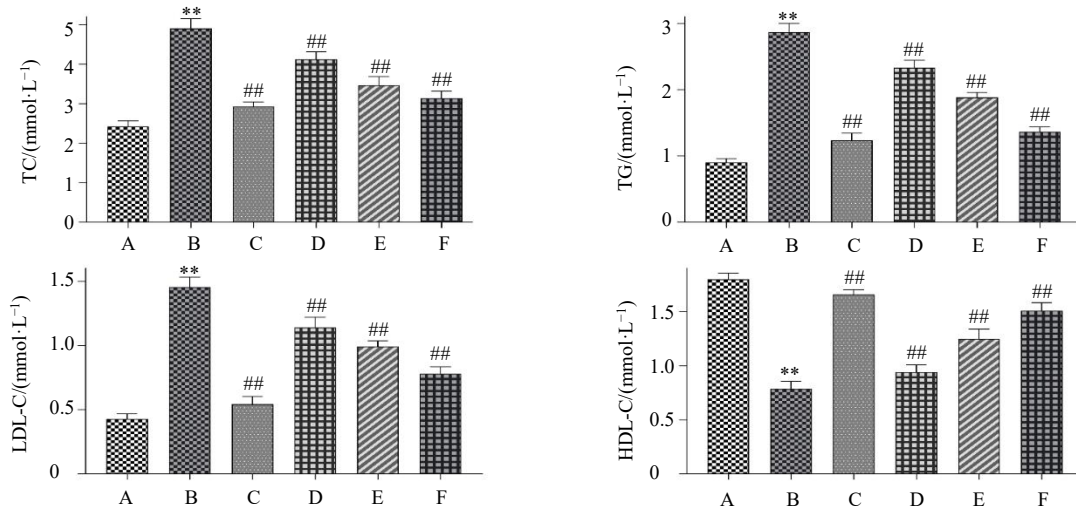


图4 双清平化方对MS大鼠血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on TC, TG, LDL-C and HDL-C levels in serum of MS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

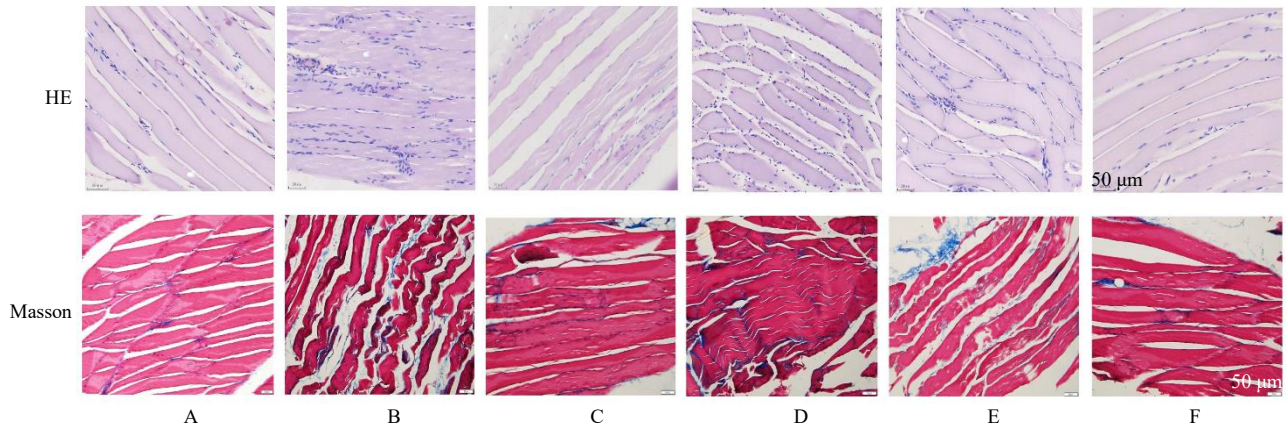


图5 双清平化方对MS大鼠骨骼肌组织病理变化的影响 (×40)

Fig. 5 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on pathological changes of skeletal muscle tissue in MS rats (×40)

细胞核增多并出现核内移，见少量炎细胞浸润；与模型组比较，双清平化方低、中剂量组肌纤维排列有所好转，细胞核增多，核内移减少，炎细胞浸润明显改善；二甲双胍组和双清平化方高剂量组纤维排列相对整齐，胞质较为均匀，细胞核形态有所好转，细胞核及核内移减少，未见炎细胞浸润。

Masson 染色结果显示，对照组大鼠腓肠肌结构完整，肌纤维排列整齐且形态规则，未见明显萎缩，肌纤维间胶原纤维较少；模型组出现增生的结缔组织，胶原纤维逐渐增多且肌纤维间距因胶原纤维的增生而变宽；与模型组比较，双清平化方低剂量组胶原纤维减少；双清平化方中剂量组肌纤维间距缩短，结缔组织和胶原纤维减少；二甲双胍组和双清平化方高剂量组肌纤维形态较规则，纤维间距缩短，胶原纤维减少，未见增生的结缔组织。

3.6 免疫组化法检测 MS 大鼠骨骼肌组织中 LC3 蛋白表达

如图6所示，与对照组比较，模型组大鼠骨骼肌组织中 LC3 蛋白阳性表达显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠骨骼肌组织中 LC3 蛋白阳性表达均显著升高 ($P < 0.01$)。

3.7 Western blotting 检测 MS 大鼠骨骼肌组织中 mTOR、Beclin1 和 LC3 蛋白表达

如图7所示，与对照组比较，模型组大鼠骨骼肌组织中 p-mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，Beclin1 和 LC3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，双清平化方高剂量组大鼠骨骼肌组织中 p-mTOR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)，Beclin1 和 LC3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。

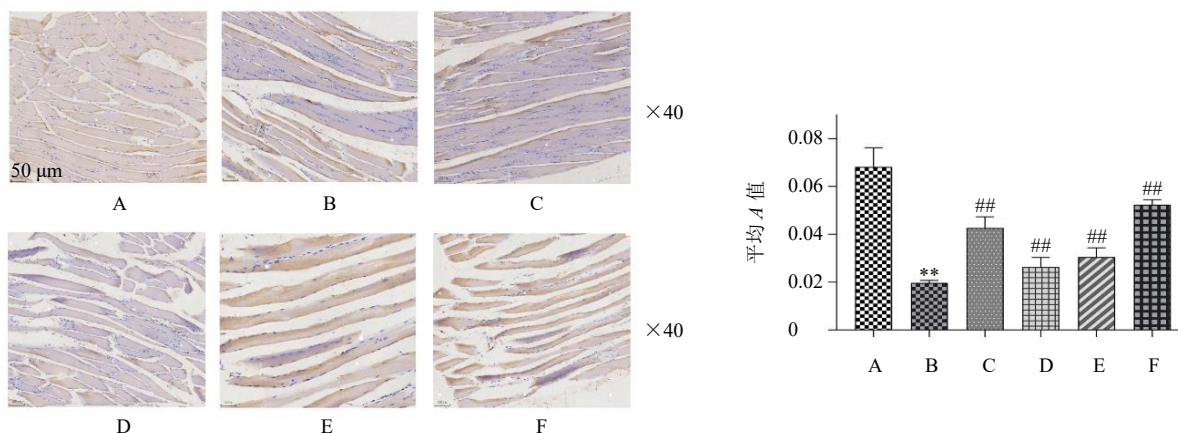


图6 双清平化方对MS大鼠骨骼肌组织中LC3蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on LC3 protein expression in skeletal muscle tissue of MS rats

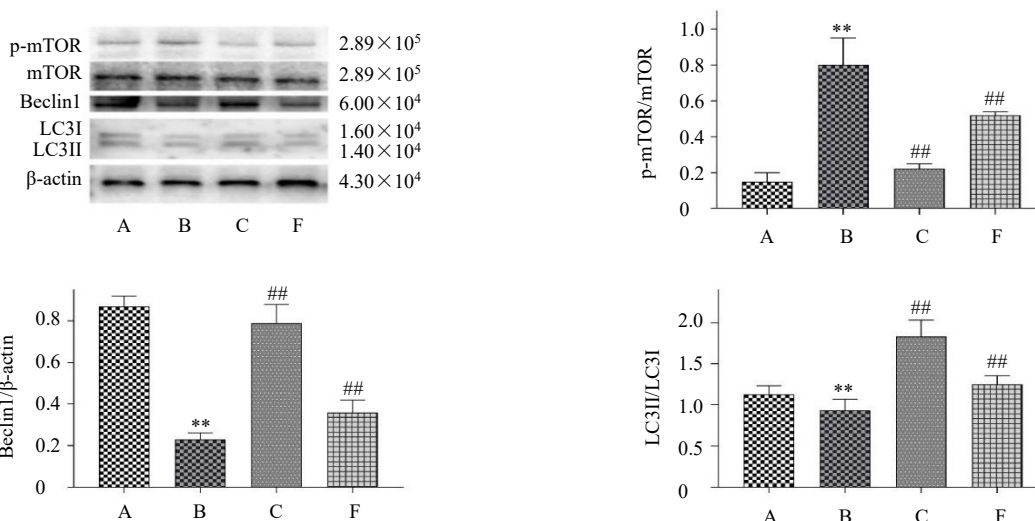


图7 双清平化方对MS大鼠骨骼肌组织中p-mTOR、Beclin1和LC3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Shuangqing Pinghua Recipe on p-mTOR, Beclin1 and LC3 protein expressions in skeletal muscle tissue of MS rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

自噬异常可通过内质网应激、氧化应激、促炎症信号途径等导致胰岛素抵抗的发生^[11]。骨骼肌是机体葡萄糖、脂质摄取和利用的主要部位,约70%的葡萄糖通过胰岛素依赖的方式被骨骼肌摄取利用,同时骨骼肌也是发生胰岛素抵抗的重要靶组织^[12]。研究发现,2型糖尿病患者骨骼肌内细胞器发生重构、外膜细胞退化及凋亡、肌膜下线粒体减少、肌细胞内脂质沉积等,在临床上表现为胰岛素抵抗,而自噬异常可能是主要原因之一^[13]。因此,探索MS骨骼肌胰岛素抵抗与自噬关系并指导药物治疗研究具有重要学术价值。改善胰岛素抵抗是治疗和预防MS的重要策略,从调节自噬途径研究中药改善胰岛素抵抗也是一个新的研究方向。骨骼肌

自噬对血糖、血脂比较敏感,高糖、高脂可激活mTOR诱导的自噬活性降低,表现为自噬体形成的标志物LC3II的表达减少^[14];Bloemberg等^[15]研究发现,骨骼肌细胞mTOR活性升高可抑制细胞自噬信号通路,参与了MS的发病。mTOR、Beclin1和LC3是自噬通路中主要标志物,可用于评价组织细胞自噬水平^[16]。mTOR是负性调节自噬的重要信号,mTOR被抑制时可诱导自噬的发生^[17];Beclin1又名Atg6,作为自噬通路上的一个平台蛋白,通过与磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)形成新复合物来调节其他ATG蛋白在自噬前体结构中定位,进而促进自噬体膜的形成并调节自噬活性^[18];LC3是定位在双层膜和自噬体的特异性信号蛋白,可剪切为LC3I和LC3II 2种同源物,

其中 LC3II 作为脂质化表达于自噬体膜上, 其含量和自噬泡的数量可以反映组织的自噬水平^[19-20]。为此, 通过观察药物对 mTOR、Beclin1 和 LC3 等主要标志物表达的影响及对 HOMA-IR、糖脂代谢指标的变化, 可进一步判断自噬与胰岛素抵抗的关系及药物对自噬的调节作用。

中医没有 MS 病名, 就其临床特征与中医脾瘵相类, 根据《黄帝内经》“肥者令人内热, 甘者令人中满”的发病机制, 结合临床证候分析发现 MS 患者嗜食肥甘厚味、精神压力大, 形体肥胖且肝阳亢盛者居多, 病机特点为肝胃火旺、气机失畅、痰浊不化^[12]。针对病机结合本课题组多年从肝胃郁热治疗 MS 经验, 选择了药食同源的中药组成双清平化方。方中夏枯草、蒲公英清肝胃郁热为君药, 桑叶、珍珠粉、决明子、生山楂、莱菔子、海藻粉、炒荞麦粉助主药平肝清胃化浊为臣药, 葛根升阳、生津为佐使药, 全方清肝胃郁热、理气化浊、升降有序。中药药理研究发现, 蒲公英、桑叶、葛根可有效改善胰岛素抵抗^[21-22]; 夏枯草、草决明、山楂、莱菔子等可有效调节血脂、降血压等, 通过理论分析全方配伍具有 MS 中医病机针对性及调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗的药理针对性, 并且配方均由药食同源中药组成, 临床应用具有良好的顺应性。为此, 本研究通过考察双清平化方对 MS 大鼠糖脂代谢及对骨骼肌自噬信号蛋白表达的影响, 评价其药理效应并初步探究其对骨骼肌自噬及胰岛素抵抗的作用机制。

本研究参照文献方法^[7-8]制备 MS 模型, 结果显示模型组大鼠体长、体质量、腹围、Lee's 指数、FBG、PG2h、OGTT-AUC、GHb、HOMA-IR 及血脂水平与对照组相比均明显升高, 表明 MS 大鼠建模成功。双清平化方干预后可降低大鼠 FBG、PG2h、OGTT-AUC、GHb、HOMA-IR 及血脂水平, 表明双清平化方对 MS 具有调节作用并改善胰岛素抵抗。通过免疫组化和 Western blotting 实验发现, 模型组大鼠骨骼肌组织中 mTOR 蛋白表达上调, Beclin1 和 LC3 蛋白表达下调, 骨骼肌出现纤维排列疏松紊乱, 胞质不匀, 细胞核增多、核内移及少量炎细胞浸润现象, 由此表明, 高脂高糖诱导的 MS 模型大鼠骨骼肌存在自噬抑制及炎症激活现象。双清平化方组大鼠骨骼肌组织中 mTOR 蛋白表达下调, Beclin1 和 LC3 蛋白表达上调, 骨骼肌病理具有一定的改善, 说明双清平化方可调节 MS 大鼠骨骼肌自噬信号蛋

白的表达, 促进高脂高糖环境下骨骼肌自噬, 对于保护骨骼肌的自身稳态是有益的。

综上所述, 双清平化方能够有效改善 MS 大鼠糖、脂代谢、胰岛素抵抗及骨骼肌的自身稳态, 其作用机制可能与下调 mTOR、上调 Beclin1 和 LC3 的蛋白表达, 调节骨骼肌自噬水平有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Razavi A C, Wong N, Budoff M, *et al.* Predicting long-term absence of coronary artery calcium in metabolic syndrome and diabetes: The MESA study [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021, 14(1): 219-229.
- [2] Alyavi A, Alyavi B, Uzokov J. Prognostic value of metabolic syndrome for the development of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 315: e180.
- [3] Koyama T, Maekawa M, Ozaki E, *et al.* Daily consumption of coffee and eating bread at breakfast time is associated with lower visceral adipose tissue and with lower prevalence of both visceral obesity and metabolic syndrome in Japanese populations: A cross-sectional study [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3090.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [5] Lu J L, Wang L M, Li M, *et al.* Metabolic syndrome among adults in China: The 2010 China noncommunicable disease surveillance [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(2): 507-515.
- [6] 王瑶瑶, 喇孝瑾, 张大伟, 等. 双清平化方对代谢综合征大鼠血压、胰岛素抵抗、RAS 系统及血管内皮功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(20): 2172-2178.
- [7] 夏燕萍, 陈刚, 俞茂华. 高糖高脂饮食诱导建立 SD 大鼠代谢综合征模型 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(17): 2607-2609.
- [8] 李耀华, 谢萍, 王娟. 代谢综合征大鼠模型的建立及评价 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(4): 86-89.
- [9] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 25.
- [10] 张全鹏, 王慧, 陈旦, 等. 水合氯醛、乌拉坦及其 1:1 混合液在 SD 大鼠麻醉中的效果比较及应用 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1208-1212.
- [11] 孙洁, 杨兵全, 孙子林. 自噬与糖尿病骨骼肌病变 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2014, 34(3): 194-196.
- [12] Urrea C, Mignogna A. Development of an expert system for pre-diagnosis of hypertension, diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome [J]. *Health Informatics J*, 2020, 26(4): 2776-2791.
- [13] 马文文, 刘康. 自噬与胰岛素抵抗的相关性探讨 [J].

- 医药前沿, 2019, 9(3): 107-108.
- [14] Choi J W, Ohn J H, Jung H S, *et al.* Carnitine induces autophagy and restores high-fat diet-induced mitochondrial dysfunction [J]. *Metabolism*, 2018, 78: 43-51.
- [15] Bloemberg D, Quadriatero J. Autophagy, apoptosis, and mitochondria: Molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(1): C111-C130.
- [16] Yadav A, Singh A, Phogat J, *et al.* Magnoflorine prevent the skeletal muscle atrophy via Akt/mTOR/FoxO signal pathway and increase slow-MyHC production in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113510.
- [17] Lenoir O, Tharaux P L, Huber T B. Autophagy in kidney disease and aging: Lessons from rodent models [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(5): 950-964.
- [18] 李恩, 叶魁, 孙君志, 等. 8周游泳运动对高脂饮食诱导胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞自噬的影响 [J]. 成都体育学院学报, 2019, 45(4): 121-126.
- [19] Chang H, Peng X, Yan X, *et al.* Autophagy and Akt-mTOR signaling display periodic oscillations during torpor-arousal cycles in oxidative skeletal muscle of Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*) [J]. *J Comp Physiol B*, 2020, 190(1): 113-123.
- [20] Brandt N, Gunnarsson T P, Bangsbo J, *et al.* Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle [J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(7): e13651.
- [21] 张新鹃, 王海凤, 孙永显, 等. 蒲公英水提取物对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(1): 17-22.
- [22] 蔡晟宇, 李佑生. 桑叶提取物调控 IRS-1/PI3K/GLUT4 通路影响 2 型糖尿病胰岛素抵抗机制研究 [J]. 新中医, 2020, 52(1): 1-6.

[责任编辑 李亚楠]