

- 7 刘莉, 萧凤回. 石斛属药用植物多糖研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 1: 77 - 80
 - 8 孙卓然, 刘圆, 李晓云, 等. 石斛不同种、不同药用部位中多糖含量测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 8: 1886 - 1888
 - 9 艾娟, 严宁, 胡虹, 等. 温度对铁皮石斛生长及生理特性的影响[J]. 云南植物研究, 2010, 5: 420 - 426
 - 10 诸燕, 斯金平, 郭宝林, 等. 人工栽培铁皮石斛多糖含量变异规律[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 427
 - 11 尚喜雨. 多糖在不同来源不同部位铁皮石斛中的分布规律研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(13): 104
- (收稿日期: 2013 - 04 - 08)
(修回日期: 2013 - 04 - 16)

祛胰抵方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞膜葡萄糖转运蛋白 4 的影响

马 建 马晓静 杜丽坤 赵 娜

摘 要 **目的** 观察不同浓度祛胰抵方对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞上葡萄糖转运蛋白 - 4 (GLUT - 4) 表达的影响并探讨其发生的可能机制。**方法** 健康的雄性 Wistar 大鼠 80 只, 随机抽取 10 只作为正常对照组 (NC), 饲以普通饲料, 其余以高脂饲料喂养 4 周后腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 建立 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠的模型。将建模成功后大鼠随机分为糖尿病模型 (DM) 组、高、中、低浓度中药组以及迪化唐錠组。NC 组与 DM 组给予生理盐水, 各组均给药 12 周。应用葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) ELISA 试剂盒测定骨骼肌组织细胞膜 GLUT - 4 蛋白的含量。**结果** 与 NC 组比较, DM 组大鼠的骨骼肌细胞中 GLUT - 4 表达明显降低; 与 DM 组比较, 药物治疗组骨骼肌细胞中 GLUT - 4 的表达明显增强。**结论** 祛胰抵方可能通过增强大鼠骨骼肌组织细胞中 GLUT - 4 的表达以改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗。

关键词 2 型糖尿病 胰岛素抵抗 葡萄糖转运蛋白 4 祛胰抵方

Quyidi Decoction in Insulin Resistance of Type 2 Diabetes Mellitus Rat Skeletal Muscle Cell Membrane Glucose Transporters4 Effect. Ma Jian, Ma Xiaojing, Du Likun, Zhao Na. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

Abstract Objective To observe the influence of Quyidifang with different concentrations on insulin resistance in the expression of glucose transporter - 4 (GLUT - 4) on skeletal muscle cells in rats and explore the possible mechanism of what may happen. **Methods** Eighty healthy male Wistar rats were used in the experiment. Ten of them were selected and allocated as normal control group (NC) randomly, and were fed with normal diet. The rest of the rats were fed with hyper - cholesterol for 4 weeks and received intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ) to established rat model of insulin resistance of type 2 diabetes mellitus. After successfully establishing models, randomly divide the rats into diabetes model (DM) group, Chinese medicine group of high, medium and low concentrations and Di - hua Tang Ingot group. Rats of NC group and DM group were received physiological saline and dosed for 12 weeks. Adapt glucose transporters 4 (GLUT - 4) ELISA kit to measure the protein content of GLUT - 4 in skeletal muscle cells membrane. **Results** Compared with NC group, the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats in DM group significantly reduced; when compared with DM group, the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats in drug therapy group noticeably strengthened. **Conclusion** Quyidifang can improve insulin resistance of type 2 diabetes mellitus by enhancing the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats.

Key words Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance; Glut - 4; Quyidi decoction

胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能受损是导致 2 型糖尿病发病的基础, 其中胰岛素抵抗是贯穿 2 型糖尿病发生及其发展的整个过程重要因素, 2 型糖尿病胰

岛素抵抗被认为是环境与基因之间相互作用的结果。在诸多候选基因当中, GLUT - 4 与 2 型糖尿病胰岛素抵抗的发生关系最为密切^[1]。近年来研究表明, 全身胰岛素抵抗主要表现是骨骼肌组织葡萄糖的代谢发生障碍。细胞膜上参与胰岛素刺激的葡萄糖摄取的 GLUT - 4 是肌肉组织葡萄糖代谢的关键因子之一, 同时它也是胰岛素抵抗机制研究的靶点之一。本

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D201072)

作者单位: 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学附属第一医院 (马建、杜丽坤); 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学 (马晓静、赵娜)

研究通过观测祛胰抵方对骨骼肌组织葡萄糖利用的关键限速膜蛋白——GLUT-4 的影响,探讨其改善胰岛素抵抗的机制。

材料与与方法

1. 材料:清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠、基础及高脂饲料(猪油 18%、蔗糖 20%、蛋黄 3%、基础饲料 59%)均由黑龙江中医药大学实验动物中心提供;STZ 为 Sigma 公司产品;祛胰抵方药物由黑龙江中医药大学附属第一医院中药局提供;迪化唐锭为澳大利亚艾华大药厂产品,规格为 500 毫克/片;拜安易血糖仪及试纸均为德国拜耳公司产品;仪器:低温高速离心机(日力 7600/7170);匀浆机(北京六一仪器厂);试剂盒为葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)ELISA,由上海高创化学科技有限公司提供。

2. 动物模型的建立:80 只清洁级健康 Wistar 雄性大鼠(体重 $200 \pm 20\text{g}$)适应性饲养 1 周后,按照数字表随机分成两组:普通饲料组(10 只)和高脂饲料组(70 只)。予以大鼠自由饮水及摄食 4 周。4 周以后,禁食不禁水隔夜 12h,高脂饲料组 70 只大鼠予以 1 次腹腔注射链尿做菌素(STZ) 30mg/kg 体质量(使用 pH 4.4 的 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠的缓冲液稀释),建模成功后大鼠随机分为糖尿病模型组(DM)、高、中、低浓度中药组以及迪化唐锭组。普通饲料喂养组的 10 只大鼠腹腔给予注射相应容量的柠檬酸-柠檬酸钠的缓冲液(pH 值 4.4),做为正常对照组(NC)。注射药物 72h 后,进行尾尖采血测量随机血糖,血糖 $\geq 16.67\text{mmol/L}$ 提示大鼠的 2 型糖尿病诱导成功。随机抽取造模成功的 60 只大鼠给予继续喂养高脂饲料。

3. 药品制备:祛胰抵方由生黄芪、西洋参、生地、苍术、茯苓、玄参、黄精、玉竹、制半夏、黄连、水蛭、蜈蚣等组成,汤剂由黑龙江中医药大学附属第一医院煎药室代煎,药液存储于 4°C 冰箱中备用。

4. 给药方法及用量:根据孙敬方主编的《动物实验方法学》,药物剂量换算如下:中药低、中、高浓度组给药量比为 1:2:4,浓度组祛胰抵方剂量为 $9.0\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,中浓度组祛

胰抵方剂量为 $18.0\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,高浓度组祛胰抵方剂量为 $36.0\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。迪化唐锭组给药量为 $117.45\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,每日灌胃 1 次,NC 组、DM 组以等量生理盐水灌胃。

5. 指标测定:治疗前,空腹 12h,尾静脉采血留取血清测定空腹血糖(FPG)、空腹血清胰岛素(FINS);治疗 12 周,末次进食进药 12h 后,行眼眶静脉采血,再次测定 FPG、FINS。两次采血均注入洁净一次性试管中,然后至 37°C 恒温箱放置 15min, $4000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,分离血清,冻存于 -20°C 。胰岛素敏感指数采用公式 $\text{ISI} = -\text{Ln}(\text{FINS} \times \text{FPG})$ 进行计算。

6. 骨骼肌组织细胞膜上 GLUT-4 的含量测定:给药 12 周,末次进食进药 12h 后,处死,快速的提取出大鼠左后肢的大腿骨骼肌组织,进行组织匀浆,将组织标本先用 PBS 洗涤,去除多余血液,匀浆化后放在 20ml PBS 中于 -20°C 放置过夜,第 2 天,经过两次反复冻融破膜,将匀浆物 $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min,取上清即可应用葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4)ELISA 试剂盒进行检测。

7. 统计学方法:组间的显著性的差异根据不同的情况,采用完全随机设计的 *t* 检验。因 GLUT-4 的含量呈偏态分布,故取其自然对数(IAI)使其正态化之后再进行分析。采用 SPSS 16.0 进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

造模后,治疗前中药低、中、高浓度、DM、迪化唐锭组 FPG、FINS 水平,明显高于 NC 组,ISI 水平与 NC 组相比明显下降($P < 0.01$);各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,中药中、高浓度组,西药组与 NC 组比较,ISI 水平升高,FPG、FINS 显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);中药中、高浓度组与迪化唐锭组比较,FPG、FINS、ISI 水平无明显差异($P > 0.05$)。这说明中药中、高浓度降血糖、胰岛素水平,改善胰岛素抵抗情况效果良好,与西药迪化唐锭效果相当。结果见表 1。

表 1 模型组与正常对照组大鼠 FPG、FINS、ISI 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	FPG (mmol/L)		FINS		ISI	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
中药低浓度组($n_1 = 12, n_2 = 10$)	$14.7 \pm 0.7^*$	13.76 ± 1.02	$22.23 \pm 1.54^*$	19.65 ± 2.61	$-5.75 \pm 0.05^*$	-5.59 ± 0.15
中药中浓度组($n_1 = 12, n_2 = 10$)	$14.17 \pm 1.35^*$	$11.72 \pm 1.29^\#$	$21.13 \pm 1.87^*$	$16.93 \pm 3.55^\#$	$-5.71 \pm 0.97^*$	$-5.27 \pm 0.2^\#$
中药高浓度组($n_1 = 12, n_2 = 11$)	$14.33 \pm 1.11^*$	$11.44 \pm 1.12^\#$	$20.96 \pm 1.54^*$	$17.07 \pm 4.58^\#$	$-5.72 \pm 0.80^*$	$-5.24 \pm 0.28^\#$
迪化唐锭组($n_1 = 12, n_2 = 11$)	$14.69 \pm 1.19^*$	$10.87 \pm 1.37^\#$	$20.79 \pm 2.36^*$	$15.62 \pm 1.9^\#$	$-5.74 \pm 0.81^*$	$-5.12 \pm 0.23^\#$
DM 组($n_1 = 12, n_2 = 10$)	$15.01 \pm 1.48^*$	16.12 ± 1.37	$20.96 \pm 1.94^*$	20.74 ± 3.83	$-5.77 \pm 0.10^*$	-5.79 ± 0.25
NC 组($n_1 = 10, n_2 = 10$)	4.39 ± 0.24	5.53 ± 1.45	10.77 ± 2.81	10.09 ± 2.17	-4.54 ± 0.54	-3.97 ± 0.39

与 NC 组相比, * $P < 0.01$; 与 DM 组相比, # $P < 0.01$; n_1 为治疗前个数, n_2 为治疗后个数

GLUT-4 在骨骼肌组织中的表达,NC 组为 $1.20 \pm 0.49\text{ng}/\text{ml}$,DM 组为 $0.75 \pm 0.07\text{ng}/\text{ml}$,迪化唐锭组为 $0.96 \pm 0.27\text{ng}/\text{ml}$,中药高浓度组为 $1.37 \pm$

$0.81\text{ng}/\text{ml}$,中浓度组为 $1.25\text{ng}/\text{ml}$,低浓度组为 $0.93 \pm 1.15\text{ng}/\text{ml}$ 。DM 组与 NC 组比较,说明 DM 组 GLUT-4 在骨骼肌组织细胞膜上的表达减少($P <$

0.05), 迪化唐锭组与 DM 组比较, 说明经西药治疗后 GLUT-4 表达增强 ($P < 0.05$), 中药低浓度组与迪化唐锭组比较差异无统计学意义, 两药疗效相当, 中药高浓度与中浓度组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 疗效相当。中浓度组与迪化唐锭组比较, 疗效优于迪化唐锭组 ($P < 0.05$)。

讨 论

2 型糖尿病以胰岛素抵抗为主。胰岛素抵抗指胰岛素作用的靶组织对胰岛素敏感性及反应性降低, 导致胰岛素生理效应降低, 机体为了达到正常生理效应需要超出正常量的胰岛素, 而导致高胰岛素血症。糖代谢方面表现为葡萄糖利用能力降低, 伴有或不伴有高血糖。研究表明, 由胰岛素介导的葡萄糖摄取, 80% 以上由骨骼肌负责, 所以在胰岛素抵抗中, 骨骼肌对葡萄糖摄取及利用的减少起重要作用。在骨骼肌组织中, 主要参与表达的是对胰岛素敏感的 GLUT-4, 骨骼肌中葡萄糖的跨膜转运只有利用 GLUT-4 才能得到实现。

GLUT-4 是主要的葡萄糖转运体, 主要存在于骨骼肌、心肌、脂肪组织中。静息状态, $> 95\%$ 的 GLUT-4 存在于细胞内管状囊泡网络内, 不足 5% 位于细胞外膜。当胰岛素与受体结合, 磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI₃K)、受体底物-1 (IRS-1) 等信号蛋白相继磷酸化, 促使 GLUT-4 转位到细胞膜。血清胰岛素水平下降时, GLUT-4 可以通过吞饮作用从细胞外膜被清除, 并且回到细胞内管状囊泡中。由此推断, GLUT-4 引起胰岛素抵抗的机制有: ① GLUT-4 活性减低, 经研究表明, 当存在胰岛素刺激时, GLUT-4 去磷酸化可以改变自身构象, 促使葡萄糖转运到自身细胞内^[2]; 胞质内钙离子浓度的升高, 可使 GLUT-4 磷酸化, 从而抑制其转运葡萄糖的活性; ② GLUT-4 基因表达受到了抑制, 研究^[3]表明, 在对 2 型糖尿病患者和健康人的骨骼肌进行了对比研究得出结论, 慢肌纤维中 GLUT-4 表达的减少加上慢肌纤维比例减少, 可能是导致骨骼肌发生胰岛素抵抗原因之一。

2 型糖尿病属于中医“消渴”范畴, 中医认为消渴病机主要是气阴两虚, 现代人饮食多肥甘厚腻, 故痰湿体质者较多。祛胰抵方旨在益气养阴、活血祛瘀, 方中西洋参、生黄芪共为君药, 二者合用, 助脾气上

升、散精达肺、兼补肺肾助蒸化敷布水津。臣以苍术、生地黄、制半夏、茯苓、黄精、玄参、玉竹。生地黄养阴生津, 清热凉血; 苍术燥湿健脾, 以助去除痰湿, 制半夏除湿化痰, 茯苓健脾、利水渗湿, 三药相合, 健脾除湿化痰; 黄精滋肾润肺、补脾益气, 玄参清热凉血、滋阴解毒, 玉竹养阴润燥、生津止渴, 三药合用, 养阴润燥、益胃生津。此外, 苍术配玄参, 开中焦郁结、健脾化痰, 二药一润一燥, 相互制约。佐以黄连、蜈蚣、水蛭, 黄连苦寒燥湿, 蜈蚣攻毒散结, 通络止痛, 水蛭破血逐瘀消癥。诸药合之, 共奏益气养阴, 活血祛瘀之功。直中病机, 标本同治。

该方以黄芪、西洋参、生地、葛根、黄连等为主要药物组成, 其中蕴含黄芪多糖、小檗碱、葛根异黄酮等几种中药提取物, 这几种提取物可不同程度地增加骨骼肌细胞的葡萄糖的摄取利用度, 以改善胰岛素抵抗, 而进一步的研究表明该作用主要是通过促进 GLUT-4 的转位来实现的^[4]。

本实验通过用高脂饮食结合 STZ 制造 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型, 以祛胰抵方干预, 并以西药迪化唐锭作对照。结果显示, 经祛胰抵方治疗后 (包含高、中、低浓度组) 的糖尿病大鼠的骨骼肌的 GLUT-4 在胞膜的表达增多, 提示祛胰抵方可以促进骨骼肌细胞膜上的 GLUT-4 表达增强, 使胰岛素敏感度及对葡萄糖利用能力提高, 这一作用低浓度中药与迪化唐锭比较效果相当, 中、高浓度中药疗效优于迪化唐锭。这对于临床改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗有非常重要的指导意义, 其可能机制是通过增强 GLUT-4 在骨骼肌细胞膜的表达改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗。

参考文献

- 1 郭仪, 石岩. 葡萄糖转运蛋白 4 与胰岛素抵抗[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(4): 63-64
- 2 孙长颢, 周晓蓉, 闻颖, 等. 共轭亚油酸对胰岛素抵抗大鼠葡萄糖载体 4 蛋白表达影响的研究[J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(1): 25-28
- 3 张增伟. 葡萄糖转运蛋白 4 在细胞中的研究进展[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(3): 191-193
- 4 王树海, 王文健, 汪雪峰, 等. 黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢及细胞分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(10): 926-928

(收稿日期: 2013-04-21)

(修回日期: 2013-05-06)