

补肾通脉方对胰岛素抵抗大鼠胰岛素信号转导的影响^{*}

黄冬梅 陆付耳 黄光英

摘要 目的 观察补肾通脉方对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗(IR)模型大鼠肌肉和脂肪组织中胰岛素刺激后的胰岛素受体(InsR)和胰岛素受体底物-1(IRS-1)酪氨酸磷酸化的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组和治疗组,治疗组以纯中药制剂补肾通脉方进行干预。模型组和治疗组大鼠均用脂肪占总热卡含量 61% 的高脂饲料饲养 8 周,正常组喂以普通饲料;常规测定空腹血糖(FBG)及葡萄糖负荷后 1、2h 血糖(BG-1h, BG-2h),以放射免疫法测定空腹血清胰岛素(Fins);采用免疫沉淀及 Western blot 技术测其肌肉及脂肪组织中胰岛素刺激后的 InsR 和 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平。结果 与模型组比较,治疗组 FBG 虽无明显变化,但 Fins 显著降低($P < 0.01$),因而胰岛素敏感指数(ISI)明显升高($P < 0.01$);治疗组 BG-1h 和 BG-2h 水平较模型组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);治疗组大鼠肌肉和脂肪组织中 InsR β 亚单位和 IRS-1 酪氨酸磷酸化蛋白电泳条带密度明显增加。结论 补肾通脉方对大鼠 IR 有显著的改善作用,其机制可能与提高 IR 大鼠肌肉和脂肪组织中 InsR 和 IRS-1 在胰岛素刺激后的酪氨酸磷酸化水平,改善胰岛素信号转导等环节有关。

关键词 胰岛素抵抗 补肾通脉方 胰岛素受体 胰岛素受体底物-1 酪氨酸磷酸化

Effects of Bushen Tongmai Recipe on Insulin Signaling in Insulin Resistant Rats HUANG Dong-mei, LU Fu-er, HUANG Guang-ying *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

Objective: To investigate the effect of Bushen Tongmai recipe (BSTMR) on the tyrosine phosphorylation of insulin receptor (InsR) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) after insulin stimulation in muscle and fat tissues of insulin resistant (IR) rats induced by high-fat forage. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into normal group (normal forage), model group (high fat forage, in which 61% calories were supplied by fat) and treated group (same forage as model group and treated with BSTMR). All animals were fed for 8 weeks, fasting blood glucose (FBG), blood glucose (BG) levels 1- and 2-hrs after glucose loading were determined routinely, serum fasting insulin (Ins) was determined with radioimmunoassay (RIA) and tyrosine phosphorylation level of InsR and IRS-1 in fatty and muscular tissues was measured by immunoprecipitation and Western blot. **Results:** Compared with the model group, FBG in the treated group changed insignificantly, but level of Fins decreased markedly ($P < 0.01$), so the insulin sensitivity index was significantly elevated in the treated group ($P < 0.01$), levels of BG 1- and 2-hrs after glucose loading in the treated group were greatly improved in comparison with those in the model group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively). Meanwhile, the density of electrophoresis bands of tyrosine phosphorylated InsR and IRS-1 proteins in muscular and fatty tissues in the treated group increased obviously. **Conclusion:** BSTMR could attenuate the insulin resistance in rats, its pharmaceutical mechanisms might be closely related with the elevation of the tyrosine phosphorylation levels of InsR and IRS-1 in muscular and fatty tissues after insulin stimulation, and improvement of insulin signal transduction in target tissues.

Key words insulin resistance, Bushen Tongmai recipe, insulin receptor, insulin receptor substrate-1, tyrosine phosphorylation

^{*} 教育部回国博士基金课题部分内容(教外司留 1998-679 号)

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(武汉 430030)

通讯作者 陆付耳, Tel 027-83662577, Fax 027-83646605, E-mail Telu@tjh.tjmu.edu.cn

随着人们生活水平的不断提高和生活方式的改变,糖尿病、肥胖、高血压等疾病的患病率日益升高。现代医学研究表明,上述疾病的发病机制中有一个共同的病理生理学基础——胰岛素抵抗(insulin resistance,IR),主要表现为高脂血症、高胰岛素血症、高血糖或糖耐量降低等。改善 IR、增强胰岛素敏感性是治疗上述疾病的共同环节。新近研制上市的第二代胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类能有效改善 IR,但价格极为昂贵,远期疗效尚待评价。如何发挥我国中医学优势,寻求能有效改善 IR 而又无明显不良反应的单味中药或复方是现代科学研究的重要课题。我们的前期工作表明,补肾通脉方临床治疗 2 型糖尿病有较好疗效,并证实该方能改善实验动物胰岛素抵抗^[1]。为进一步探讨其改善 IR 的作用机理,本实验观察了补肾通脉方对高脂饲料喂养诱导的 IR 大鼠肌肉和脂肪组织中胰岛素刺激后的胰岛素受体(insulin receptor, InsR)和胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)酪氨酸磷酸化的影响。现报告如下。

材料与方法

1 实验动物及饲料 150~200g 的雄性 Wistar 大鼠,购自湖北省卫生防疫站动物中心,均单笼饲养,明暗周期为 12h/12h,自由摄食、饮水。基础饲料购自同济医学院实验动物中心,高脂饲料依文献资料^[2]略加改动后自行配制,其中脂肪类(以饱和脂肪酸为主)占总热卡含量的 61%,蛋白质占 19%,碳水化合物占 20%。

2 药物及试剂 补肾通脉方(由黄芪、何首乌、肉苁蓉、丹参、三七、生地等组成)按水煎醇沉的工艺路线提取浸膏,由同济医院中西医结合研究所制备,浓度为 100%(1g 生药/ml)。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)试剂盒购自温州东欧生物工程有限公司;胰岛素放免试剂盒购自武汉亚法生物技术有限公司;各种抗体均购自 SANTA CRUZ 公司;化学发光试剂盒购自美国 PIERCE 公司。

3 动物分组及处理 动物先普食适应性喂养 2 周后,随机分为正常组、模型组和治疗组。正常组喂以普通饲料,模型组、治疗组喂以高脂饲料,喂养时间为 8 周;治疗组同时每天灌服补肾通脉浸膏(12.25g·kg⁻¹·d⁻¹),模型组和正常组灌服等容量蒸馏水。末次给药后禁食 12h 作葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT),腹腔注射葡萄糖(2g·kg⁻¹)前及后 1、2h 分别经断尾采血,测其空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, Fins)、葡萄糖负荷后 1h 血

糖(BG-1h)、2h 血糖(BG-2h),并计算胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index, ISI),后者采用李光伟等^[3]提出的方法 $\ln[1/(FBG \times Fins)]$ 。GTT 结束后,继续饲养大鼠 1 周,禁食 12h 后从门静脉推注胰岛素(剂量为 10⁻⁵mmol·kg⁻¹),注射后 100s 取副睾旁脂肪组织,120s 取大腿肌肉组织,迅速冻存于液氮中,留以待测 InsR 和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平。

4 检测指标及方法

4.1 生化指标的检测 血糖用 One Touch II 血糖仪测定,血清胰岛素用放免法测定,血清甘油三酯、总胆固醇为酶法测定,均严格按试剂盒说明书进行。

4.2 InsR 和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平的检测 采用免疫沉淀和 Western blot 方法观察各组大鼠脂肪及肌肉组织中 InsR 和 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平。胰岛素刺激前后的肌肉及脂肪组织匀浆后提取蛋白质,考马斯亮蓝法测其蛋白浓度。取各样本蛋白质 2mg,分别加入抗胰岛素受体抗体和抗 IRS-1 抗体,4℃ 冰箱内放置过夜后加入蛋白 A-琼脂(protein A-agarose),继续 4℃ 冰箱内放置 2h。洗涤免疫沉淀物后加入 Laemmli 上样缓冲液,煮沸 3min,7.5% 和 6% 的 SDS-PAGE 分离蛋白,电转移法使蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,以含 3% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液(含 0.05% Tween20)封膜后,加入抗磷酸酪氨酸抗体,室温下轻摇 2h。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇 1h,洗涤后用增强化学发光法(ECL)显像曝光,应用激光扫描仪测各条带光密度。

5 统计学处理 应用 t 检验进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 各组体重情况 见表 1。各组在基础状态时体重无明显差异,但在喂养 8 周后,模型组与正常组体重无明显差别,治疗组体重明显低于模型组与正常组(均 $P < 0.01$)。

表 1 补肾通脉方对 IR 大鼠体重的影响 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	基础体重	喂养 8 周后体重
正常	9	230.89 ± 7.84	356.33 ± 7.17
模型	9	239.89 ± 7.87	343.56 ± 7.60
治疗	9	226.67 ± 5.61	312.67 ± 5.54* [△]

注 与正常组比较,* $P < 0.01$ 与模型组比较,[△] $P < 0.01$

2 各组 FBG、Fins、ISI 及糖耐量比较 见表 2。各组 FBG 变化差异无显著性 模型组空腹 Fins、BG-1h 及 BG-2h 水平均显著高于正常组(均 $P < 0.05$),ISI

表 2 补肾通脉方对 IR 大鼠 FBG、Fins、ISI 及糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	Fins (mU/L)	ISI	BG-1h (mmol/L)	BG-2h (mmol/L)
正常	9	3.40±0.56	29.832±1.816	-4.513±0.110	4.640±0.483	3.233±0.285
模型	9	3.56±0.70	48.846±5.787*	-5.170±0.130*	8.330±0.668*	5.422±0.344*
治疗	9	3.62±0.68	23.211±2.787 ^{△△}	-4.230±0.165 ^{△△}	6.367±0.534* [△]	4.611±0.353 ^{△△}

注 与正常组比较,**P*<0.05 与模型组比较,[△]*P*<0.05,^{△△}*P*<0.01

显著低于正常组(*P*<0.05);与模型组比较,治疗组 Fins、BG-1h 及 BG-2h 水平均明显降低(*P*<0.05 或 *P*<0.01),而 ISI 则显著升高(*P*<0.01) 治疗组除 BG-1h 较正常组增高(*P*<0.05)外,其他各项指标与正常组比较差异均无显著性。

3 各组血脂比较 见表 3。模型组与治疗组血清 TG 均显著高于正常组(均 *P*<0.01),治疗组与模型组之间差异无显著性;各组血清 TC 水平差异无显著性。

表 3 补肾通脉方对 IR 大鼠血脂的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TG	TC
正常	9	1.00±0.17	1.93±0.06
模型	9	2.78±0.32*	2.41±0.16
治疗	9	2.27±0.18*	1.99±0.10

注 与正常组比较,**P*<0.01

4 各组脂肪及肌肉组织中 InsR 和 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平比较 正常组及治疗组脂肪组织在胰岛素刺激后的 InsR 酪氨酸磷酸化的 95KD 蛋白电泳条带,经光密度扫描分别为 13.68 和 18.16,而各组胰岛素刺激前及模型组胰岛素刺激后的酪氨酸磷酸化水平均未测出,见图 1。

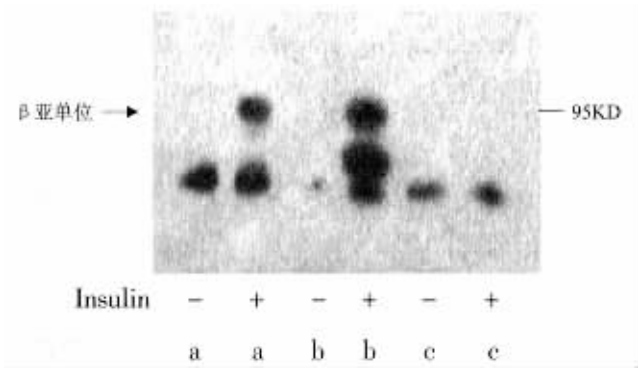


图 1 脂肪组织胰岛素 β 亚单位的酪氨酸磷酸化

注 a 为正常组,b 为治疗组,c 为模型组(下图同)

肌肉组织 InsR 酪氨酸磷酸化 95KD 蛋白电泳条带经光密度扫描,在胰岛素刺激前后正常组(10.10 与 16.97)和治疗组(15.36 与 24.47)约分别增加了 68% 和 59.3%,模型组(13.98 与 13.86)无显著变化,

见图 2。

脂肪组织 IRS-1 酪氨酸磷酸化的 185KD 蛋白电泳条带经光密度扫描,在胰岛素刺激前后正常组(20.35 与 39.85)、治疗组(8.37 与 35.14)及模型组(13.98 与 29.39)分别增加了 95.8%、319.8% 和

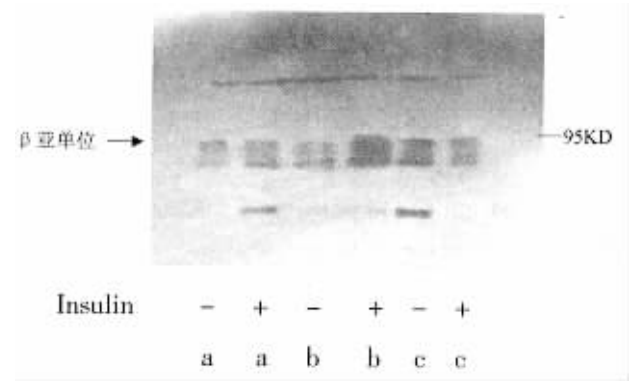


图 2 肌肉组织胰岛素受体 β 亚单位的酪氨酸磷酸化

110.2%,虽模型组与正常组 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平增加幅度无显著差异,但治疗组则显著增加;此外,模型组刺激后的 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平低于正常组及治疗组,而治疗组则接近正常组,见图 3。

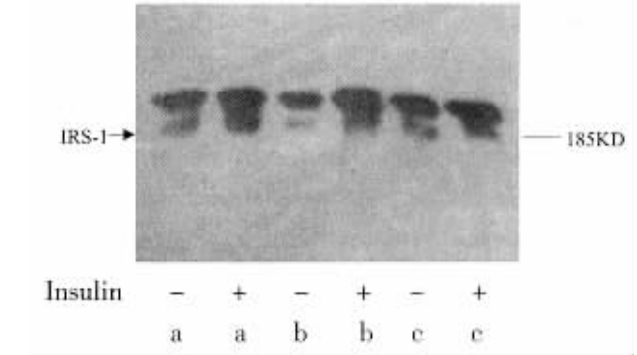


图 3 脂肪组织 IRS-1 的酪氨酸磷酸化

肌肉组织 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平,其 185KD 蛋白电泳条带经光密度扫描,在胰岛素刺激前后正常组

(15.03 与 45.66)、治疗组(25.23 与 39.12)及模型组(3.89 与 13.78)分别增加了 203.8%、54.7% 和 254.2%,但模型组胰岛素刺激前后的 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平均显著降低,而治疗组则接近正常,见图 4。

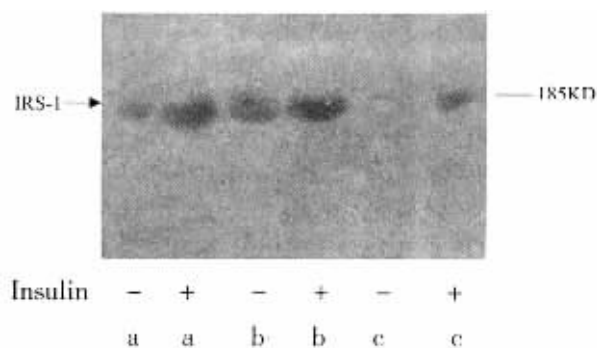


图 4 肌肉组织 IRS-1 的酪氨酸磷酸化

讨 论

根据中医学理论,笔者曾提出关于 IR 形成的肾虚血瘀的病因病机理论^[4]。胰岛素抵抗综合征包括高脂血症、高血压病、高胰岛素血症、糖尿病或糖耐量降低等病症,以代谢紊乱和(或)退行性病变为其特征,该类病症均以虚为本,虽然病变可累及五脏,但五脏皆源于肾,故以肾虚为关键病机。久病必瘀,故肾虚日久,还可兼有血瘀。根据 IR 的中医肾虚血瘀理论组方,具有补肾益气、活血化瘀作用的补肾通脉方在临床上治疗该类病症效果良好,且我们在前期实验工作中证实补肾通脉方确能有效改善高脂高热卡饲料喂养动物诱发的 IR,本研究进一步探讨其改善 IR 的作用机理。

IR 形成的机制十分复杂,多在复杂的遗传背景基础上由各种环境因素诱导而产生,其中胰岛素信号转导障碍是多因素导致 IR 形成的共同重要环节。胰岛素经血液循环到达靶组织,并与其上的胰岛素受体 α 亚单位相结合,激活胰岛素受体 β 亚单位的内在激酶活性。被激活的胰岛素受体 β 亚单位进一步磷酸化细胞内信号分子 IRS-1,后者被磷酸化后即表现出一种特异性结合位点,能募集并激活含有 SH2 区域的蛋白质,使得信号以激酶链式反应下传。InsR 和 IRS-1 作为胰岛素受体信号转导的两个起始而重要的信号分子,其磷酸化水平和激酶活性降低可引起胰岛素生物效应减弱,并最终导致 IR 形成。近来研究发现,IR 状态时肌肉和脂肪组织中 InsR 和 IRS-1 在胰岛素刺激

后的酪氨酸磷酸化水平降低^[5,6],胰岛素信号转导减弱。因此,从胰岛素信号转导途径入手将有助于阐明药物或其他干预因素改善 IR 的分子机制。

本实验采用高脂高热卡饲料喂养大鼠建立 IR 模型,观察补肾通脉方对 IR 大鼠糖和脂肪代谢的影响,从 IR 大鼠肌肉和脂肪组织 InsR 和 IRS-1 在胰岛素刺激下的酪氨酸磷酸化水平,探讨其作用机理。结果表明模型组大鼠虽 FBG 无明显升高,但 F_{ins} 水平显著升高,ISI 显著降低,且在葡萄糖负荷后 1h、2h 血糖均显著高于正常组,提示本实验所用动物模型基本符合 IR 的特征和要求。与模型组比较,治疗组 F_{ins} 水平显著降低,ISI 明显升高,葡萄糖负荷后 1h、2h 血糖均显著降低,提示补肾通脉方能有效减轻或延缓高脂高热卡饮食导致的糖耐量异常、高胰岛素血症,改善或预防胰岛素抵抗的形成。采用 Western blot 技术,分别对各组大鼠肌肉和脂肪组织在胰岛素刺激前后的 InsR 和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平及其变化进行检测,通过对 InsR 之 95KD 和 IRS-1 之 185KD 的酪氨酸磷酸化蛋白进行电泳分析,扫描其条带之光密度,结果显示,补肾通脉方能有效改善 InsR 和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平,从而改善肌肉和脂肪组织中胰岛素受体信号转导,防治胰岛素抵抗。本实验初步阐明了补肾通脉方通过改善胰岛素信号转导、增强胰岛素敏感性而防治胰岛素抵抗的作用机理,为临床应用中医补肾化瘀法防治胰岛素抵抗综合征提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 陆付耳,杨明炜,邹欣,等. 补肾通脉方对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响. 华中科技大学学报(医学版) 2002;31(1):73-74.
- 2 李晨钟,张素华,舒昌达,等. 用高脂膳食复制胰岛素抵抗大鼠模型. 基础医学与临床杂志 2000;20(3):93-95.
- 3 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. 中华内科杂志 1993;32(10):656-659.
- 4 陆付耳. 肾虚血瘀证与胰岛素抵抗. 见:周光召主编. 西部大开发,科教先行与可持续发展——中国科协 2000 年学术年会文集. 北京:中国科学技术出版社,2000:1144.
- 5 Hotamisligli GS, Budavari A, Murray D, et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. J Clin Invest 1994;94:1543-1549.
- 6 Hotamisligli GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. Science 1996;271:665-668.

(收稿 2002-08-16 修回 2002-10-15)