

贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病及肝脏盐诱导激酶 1 表达的影响

郑欢^{1,2} 洪士聪¹ 余杰³ 文秀英⁴

摘要 **目的** 观察贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝的作用及其对大鼠肝脏盐诱导激酶 1 (salt-inducible kinase 1, SIK1)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol-regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 表达的影响。**方法** 应用高糖高脂饮食结合小剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 腹腔注射建立 2 型糖尿病大鼠模型, 将成模大鼠随机分为模型组、贞清方组、二甲双胍组, 每组 8 只, 并设立正常对照组 8 只, 贞清方组给予贞清方每日 12 g 生药/kg 灌胃, 二甲双胍组给予二甲双胍混悬液每日 150 mg/kg 灌胃, 正常对照组及模型组以等体积蒸馏水灌胃。持续治疗 12 周。检测各组大鼠空腹血糖 (FBG)、游离脂肪酸 (FFA)、血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 及天冬氨酸转氨酶 (AST), 称体重和肝脏湿重并计算肝重指数, 测肝脏 TG 含量, HE 染色和免疫组织化学法观察大鼠肝脏病理变化及 SIK1 在肝脏的表达, RT-PCR 和 Western blot 检测各组大鼠肝脏组织 SIK1、SREBP-1c mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠 FBG、FFA、TG、TC、ALT、AST 水平、肝重指数和肝脏 TG 含量显著升高 ($P < 0.01$), 肝脏重度脂肪变性, 肝 SIK1 mRNA 和蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$), SREBP-1c mRNA 和蛋白表达增多 ($P < 0.01$); 药物治疗后, 与模型组比较, 贞清方组与二甲双胍组大鼠 FBG、FFA、TG、TC、ALT、AST 及肝重指数均降低, 肝脏 TG 含量下降, SIK1 mRNA 和蛋白表达明显增多, 而 SREBP-1c mRNA 和蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时大鼠的肝脏病变程度得到了改善。贞清方组 FBG、TG、TC、ALT、AST、肝 TC 含量、SIK1 mRNA 和蛋白表达、SREBP-1c mRNA 和蛋白表达均优于二甲双胍组 (均 $P < 0.05$)。**结论** 本实验发现 2 型糖尿病并发非酒精性脂肪肝大鼠肝脏 SIK1 表达降低, 同时贞清方可减轻 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病变, 其治疗作用与其上调肝脏组织 SIK1 表达有关。

关键词 2 型糖尿病; 贞清方; 非酒精性脂肪肝; 盐诱导激酶 1; 固醇调节元件结合蛋白-1c

Effect of Zhenqing Recipe on Non-alcoholic Fatty Liver in Type 2 Diabetes Rats and the Expression of SIK1 ZHENG Huan^{1,2}, HONG Shi-cong¹, YU Jie³, and WEN Xiu-ying⁴ 1 2010 Postgraduate, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430077), China; 2 Department of Endocrinology, First Hospital of Putian City, Fujian (351100), China; 3 2010 Doctor, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430077), China; 4 Department of Integrative Medicine, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430077), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Zhenqing Recipe (ZQR) on non-alcoholic fatty liver (NAFL), and the expression of hepatic salt-inducible kinase 1 (SIK1) and sterol-regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) in type 2 diabetes rats. **Methods** A rat model of type 2 diabetes was established by high fat/sucrose diet combined with intraperitoneal injection of small dose streptozotocin (STZ). Modeled rats were randomly divided into the model group, the ZQR group, and the metformin group, 8 in each group. Eight rats were recruited as a normal control group. ZQR at the daily dose of 12 g

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30672730); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20110142110016)

作者单位: 1. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院 2010 级硕士研究生 (武汉 430077); 2. 福建省莆田市第一医院内分泌科 (福建 351100); 3. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院 2010 级博士研究生 (武汉 430077); 4. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院中西医结合科 (武汉 430077)

通讯作者: 文秀英, Tel: 027-86785679, E-mail: wenxyoung@hust.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0846

crude drugs/kg was administered to rats in the ZQR group by gastrogavage. Metformin suspension at the daily dose of 150 mg/kg was administered to rats in the metformin group by gastrogavage. Equal volume of distilled water was administered to rats in the normal control group and the model group. All medication lasted for 12 weeks. The levels of fasting blood glucose (FBG), free fatty acid (FFA), serum triglyceride (TG), serum total cholesterol (TC), serum alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were detected. The body weight and wet liver weight were weighed, and the liver weight index calculated. The liver TG content was measured. The pathological changes of liver and the expression of SIK1 were observed by HE staining and immunohistochemistry. The mRNA and protein expression of SIK1 and SREBP-1c were detected using RT-PCR and Western blot. Results Compared with the normal control group, FBG, FFA, TG, TC, ALT, AST, liver weight index, and liver TG contents significantly increased ($P < 0.01$); liver steatosis was severe, the mRNA and protein expression of SIK1 obviously decreased ($P < 0.01$); mRNA and protein expression of SREBP-1c increased ($P < 0.01$). After drug therapy, compared with the model group, FBG, FFA, TG, TC, ALT, AST, and liver weight index significantly decreased, liver TG contents significantly decreased, the mRNA and protein expression of SIK1 obviously increased, while mRNA and protein expression of SREBP-1c obviously decreased ($P < 0.05, P < 0.01$) in the ZQR group and the metformin group ($P < 0.05, P < 0.01$); and the pathological changes were also improved. All the indices were improved more in the ZQR group (all $P < 0.05$). Conclusion In this experiment, we found that the expression of SIK1 decreased in NAFL rats with type 2 diabetes. ZQR could alleviate lesion of NAFL type 2 diabetes rats possibly by up-regulating hepatic SIK1 expression at mRNA and protein levels.

KEYWORDS type 2 diabetes; Zhenqing Recipe; non-alcoholic fatty liver; salt-inducible kinase 1; sterol regulatory element binding-protein-1c

2 型糖尿病患者因糖脂代谢紊乱,血液游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)形成增多,进入肝脏的脂肪酸增加,使肝脏内甘油三酯(TG)形成增多,所以容易形成非酒精性脂肪肝^[1]。非酒精性脂肪肝是代谢综合征的肝脏表现,它与 2 型糖尿病和脂代谢紊乱关系密切^[2],且糖尿病是非酒精性脂肪肝发生的独立危险因素^[3]。临床研究显示,糖尿病患者中非酒精性脂肪肝的患病率高达 42.6%^[4]。所以,寻找治疗 2 型糖尿病患者非酒精性脂肪肝的药物靶标是当前科学研究中的重要任务。

盐诱导激酶 1 (salt-inducible kinase 1, SIK1) 在糖脂代谢中发挥重要作用^[5,6],近期研究发现 SIK1 直接磷酸化固醇调节元件结合蛋白-c (SREBP-1c),调控脂质代谢^[7]。而 SREBP-1c 主要参与调节肝脏中脂肪酸和 TG 的合成^[8],并参与非酒精性脂肪肝的发生发展^[9]。目前研究显示中药复方治疗 2 型糖尿病并发非酒精性脂肪肝有其优越性^[10]。贞清方是临床验方,由女贞子、地龙和山药等组成,笔者前期研究发现贞清方能有效降低 2 型糖尿病大鼠糖脂水平,改善 2 型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗^[11]。由于 SIK1 可调节 SREBP-1c 表达,而贞清方是否通过调控肝脏 SIK1 表达而影响 SREBP-1c 的表达

尚不明确。因此,笔者通过建立 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝模型,观察 SIK1 在糖尿病大鼠肝脏组织的表达,以及贞清方对大鼠肝脏 SIK1 及 SREBP-1c 表达水平的影响,研究贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝影响及可能机制。

材料与方法

1 动物 纯系 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 46 只,清洁级,体重 140 ~ 160 g,购自湖北省医学科学院实验动物中心,生产许可证号:SYXK(鄂)2010-0057。饲养在华中科技大学同济医学院 SPF 级动物房。

2 药物 贞清方由女贞子、地龙和山药组成(武汉龙泰药业有限责任公司),中药女贞子和山药采用水煎醇沉法,提取液经过滤浓缩,真空干燥后,其提取干膏收率约为 19%;且以女贞子主要成分齐墩果酸含量(≥ 1.7 mg/g 生药)作为控制指标。地龙等中药则采用水提,提取液过滤浓缩,经真空干燥后,提取干膏收率约为 12%;以次黄嘌呤含量(> 3.6 mg/g 生药)作为控制指标。将所有提取液混合均匀,用蒸馏水配成 2 g 生药/mL,4 °C 保存。二甲双胍片(100 mg, Sigma 公司,美国)用双蒸水配置成 30 mg/mL 的混悬液。

3 试剂与仪器 链脲佐菌素(streptozotocin,

STZ) (Sigma 公司, 美国); TG 试剂盒 (北京福瑞生物工程公司); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 兔抗大鼠 SIK1、小鼠抗大鼠 SREBP-1c 和小鼠抗大鼠 β -actin 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗和羊抗小鼠二抗 (Santa Cruz 公司, 美国); ECL 增强化学发光试剂 (Santa Cruz 公司, 美国); DAB 显色剂、两步法兔/鼠通用型免疫组化试剂盒 (天津津脉生物技术有限公司); 引物、Trizol (Invitrogen 公司, 美国); RT-PCR 试剂盒、Marker (北京天根生化科技有限公司); 胆固醇及 0.3% 的胆酸钠 (郑州利伟生物实业有限公司), 蛋黄粉 (艾格生物制品有限公司), 猪油为市售。5415R 型 4 °C 离心机 (Eppendorf 公司, 德国); 5331 型 Master cycle gradient PCR 扩增仪 (Eppendorf 公司, 德国), DYY-5 型稳压稳流电泳仪、DYCP-31C 型电泳槽 (六一仪器厂, 中国), JS-300 凝胶图像分析仪 (培清科技公司, 中国), UV4802 紫外可见分光光度仪 (尤尼柯仪器有限公司, 中国)。

4 模型建立、分组及用药方法 46 只雄性 Wistar 大鼠普通饲料适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分组, 取 8 只大鼠作为正常对照组, 喂以常规饲料, 其余用于建立 2 型糖尿病非酒精性脂肪肝模型, 给予高脂饲料 (5% 蔗糖, 10% 猪油, 1% 胆固醇, 5% 蛋黄粉, 0.1% 胆酸盐, 78.9% 常规饲料) 喂养 4 周后, 给予 STZ 亚致病剂量 (35 mg/kg) 1 次性腹腔注射, 正常组仅注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。3 天后尾静脉采血测空腹血糖, 每周测 2 次, 以空腹血糖 (FBG) >11.1 mmol/L 为标准判定为 2 型糖尿病模型。共有 24 只成模, 将成模大鼠随机分为糖尿病模型组、贞清方组和二甲双胍组, 各组均为 8 只, 继续予以高脂饲料喂养, 为 2 型糖尿病非酒精性脂肪肝模型。贞清方组给予贞清方每日 12 g 生药/kg 灌胃, 二甲双胍组给予二甲双胍混悬液每日 150 mg/kg 灌胃, 正常组及模型组以等体积蒸馏水灌胃。持续治疗 12 周, 每周称重 1 次, 根据体重变化调整给药剂量。

5 观察指标及方法

5.1 一般情况 观察实验过程中大鼠一般精神状态、皮毛光泽程度、活动情况及死亡情况。

5.2 肝重指数的测定 实验结束, 称大鼠体重。给予戊巴比妥钠麻醉, 灌流后, 摘除肝脏称重, 用于计算肝重/体重比, 即肝重指数。

5.3 大鼠生化指标及肝 TG 含量的测定 所有大鼠治疗 12 周后大鼠尾静脉采空腹血, 分离血清, 用葡萄糖氧化酶法测定 FBG, 用比色法测定 FFA, 全自

动生化仪测定 TG、TC、ALT、AST。用 GPO-PAP 比色法测定肝 TG 含量。

5.4 肝脏组织病理学观察 取肝右叶相同部位肝组织, 经 10% 的福尔马林液固定 24 h, 脱水、常规石蜡包埋、脱蜡、切片, 行 HE 染色。光镜下观察肝脏组织形态学改变。

5.5 大鼠肝组织中 SIK1 表达的测定 采用免疫组化化学法检测 SIK1 在肝组织中的表达。免疫组化采用 Envision 两步法, DAB 显色, 以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液作阴性对照, 以细胞质或 (和) 细胞核中出现棕色颗粒状物质为阳性。免疫组化图像的分析采用同济医学院病理学系 HMIAS-2 000 型全自动医学彩色图像分析系统, 分析图像经标准灰度校正后, 每张切片随机选择 5 个高倍视野, 在同等条件下测定每个视野 SIK1 的平均光密度值 (OD), 取其平均值进行统计学分析。

5.6 大鼠肝组织中 SIK1 和 SREBP-1c mRNA 的表达 采用 RT-PCR 法测定肝脏中 SIK1 和 SREBP-1c mRNA 的表达。取 100 mg 肝脏组织, 用 Trizol 试剂提取大鼠肝脏总 RNA, 其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 范围内为合格标本。分别取样本 5 μ g, 反转录制备 cDNA。具体引物序列及扩增长度见表 1。SIK1、SREBP-1c 及 β -actin 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 次循环后, 再行 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应后, 取扩增产物 7 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, JS-300 凝胶图像分析系统测定特异性条带的光密度比值。

表 1 SIK1、SREBP-1c、 β -actin 引物序列及扩增长度

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
SIK1	上游引物: 5' - TTTGCGGCTATTTACTACCT - 3'	253
	下游引物: 5' - GCTGAAGCGAACTGTGGAGAT - 3'	
SREBP-1c	上游引物: 5' - GGAGCCATGGATTGCACATT - 3'	191
	下游引物: 5' - AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA - 3'	
β -actin	上游引物: 5' - CGTTGACATCCGTAAGACCTC - 3'	110
	下游引物: 5' - TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT - 3'	

5.7 大鼠肝组织中 SIK1 和 SREBP-1c 蛋白表达 取 100 mg 肝脏组织, 提取肝脏组织总蛋白, 每个样品取等量蛋白 50 μ g, 进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后分离的蛋白质转移到 PVDF 膜。5% BSA 室温下封闭 2 h, 分别加入羊抗大鼠 SIK1 (稀释比例 1:500)、小鼠抗大鼠 SREBP-1c (稀释比例 1:500)、小鼠抗大鼠 β -actin (稀释比例 1:1 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜。洗膜后辣根过氧化物酶标记的二

抗羊抗兔 IgG 或羊抗小鼠 IgG (稀释比例 1:5 000), 室温孵育 2 h。TBST 洗膜后加 ECL 试剂, 显影成像。用美国 UVP 公司 LabWorks4.5 软件对 Western blot 条带进行定量分析。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 正常对照组大鼠生长发育良好, 体力充沛, 活泼好动, 毛色光滑, 食欲正常。模型组大鼠生长发育迟缓, 反应迟钝, 毛凌乱无光泽, 并出现多饮、多尿、多食、消瘦等症状。用药各组大鼠均有不同程度的上述改变, 但较模型组轻。实验过程中, 模型组、贞清方组和二甲双胍组大鼠因灌胃各死亡 2 只。

2 各组大鼠体重、肝湿重及肝重指数的比较 (表 2) 与正常对照组比较, 模型组体重明显下降, 肝湿重及肝重指数明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 贞清方组和二甲双胍组大鼠体重明显增高 ($P < 0.05$), 贞清方组肝湿重及肝重指数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠体重、肝湿重及肝重指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	肝湿重(g)	肝重指数(%)
正常对照	8	524.1 ± 19.6	23.66 ± 2.33	4.51 ± 0.32
模型	6	388.5 ± 14.4*	30.38 ± 3.53*	7.80 ± 0.66*
贞清方	6	431.5 ± 18.9 [△]	25.10 ± 2.93 [△]	5.82 ± 0.68 ^{△△}
二甲双胍	6	412.3 ± 17.3 [△]	26.95 ± 2.15	6.53 ± 0.51

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3 各组大鼠 FBG、FFA、TG 及 TC 水平比较 (表 3) 与正常对照组比较, 模型组大鼠 FBG、FFA、TG 及 TC 均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 贞清方组和二甲双胍组大鼠 FBG、FFA、TG、TC 均明显降低 ($P < 0.01$); 与二甲双胍组比较, 贞清方组大鼠 FBG、TG 和 TC 明显降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠 FBG、FFA、TG 及 TC 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG	FFA	TG	TC
正常对照	8	4.55 ± 0.45	1.06 ± 0.11	1.04 ± 0.10	1.68 ± 0.21
模型	6	26.41 ± 2.56*	3.63 ± 0.27*	2.09 ± 0.22*	4.17 ± 0.15*
贞清方	6	9.29 ± 2.38 ^{△△}	1.71 ± 0.27 [△]	1.32 ± 0.19 ^{△△}	3.75 ± 0.15 ^{△△}
二甲双胍	6	12.94 ± 2.78 [△]	1.97 ± 0.48 [△]	1.77 ± 0.15 [△]	3.93 ± 0.10 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, [△] $P < 0.05$

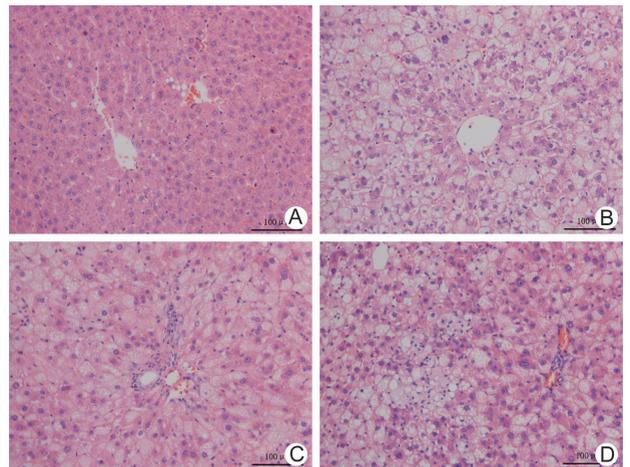
4 各组大鼠 ALT、AST 及肝 TG 含量比较 (表 4) 与正常对照组比较, 模型组 ALT、AST 和肝 TG 含量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 贞清方组和二甲双胍组大鼠 ALT、AST 和肝 TG 含量下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与二甲双胍组比较, 贞清方组大鼠肝 ALT、AST、肝 TG 含量下降明显 ($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠 ALT、AST 及肝 TG 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	肝脏 TG 含量 (mg/100 mg 肝脏组织)
正常对照	8	50.18 ± 5.23	177.41 ± 10.73	0.029 ± 0.004
模型	6	170.90 ± 10.57*	300.98 ± 16.21*	0.062 ± 0.006*
贞清方	6	99.03 ± 8.57 ^{△△}	194.80 ± 12.02 ^{△△}	0.042 ± 0.004 ^{△△}
二甲双胍	6	122.73 ± 9.29 [△]	227.61 ± 16.42 [△]	0.048 ± 0.004 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, [△] $P < 0.05$

5 各组大鼠肝脏组织病理变化 (图 1) 肝脏组织切片光镜下可见正常对照组肝组织肝小叶结构正常, 肝细胞形态大小均匀一致, 肝细胞分界清, 肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状整齐排列。模型组肝小叶结构明显紊乱, 肝细胞索模糊, 肝窦消失, 肝细胞高度气球样变, 以大泡性为主的脂肪变性, 为重度脂肪肝改变, 贞清方和二甲双胍组治疗组大鼠肝细胞索模糊, 肝窦狭窄, 肝细胞内脂滴减少, 以大、小泡性混杂为主, 为中度脂肪肝改变。



注: A 为正常对照组; B 为模型组; C 为贞清方组; D 为二甲双胍组

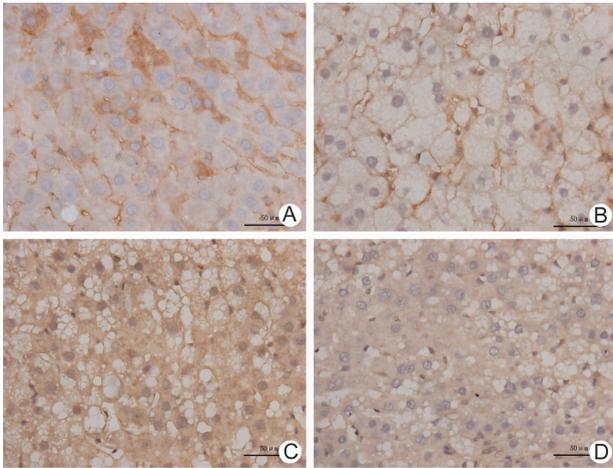
图 1 各组大鼠肝脏组织病理变化 (HE, ×200)

6 各组大鼠肝组织中 SIK1 表达比较 (表 5, 图 2) 正常对照组大鼠肝组织 SIK1 蛋白在肝细胞胞质表达, 细胞核无表达。与正常对照组比较, 模型组肝脏 SIK1 蛋白表达明显减少, 细胞核也无表达, 且差异有

表 5 各组大鼠肝脏组织 SIK1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SIK1
正常对照	8	0.96 ± 0.11
模型	6	0.63 ± 0.03 *
贞清方	6	1.49 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta$
二甲双胍	6	1.07 ± 0.16 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较: $\Delta P < 0.05$,
 $\Delta\Delta P < 0.01$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为正常对照组;B 为模型组; C 为贞清方组;D 为二甲双胍组

图 2 各组大鼠肝脏组织 SIK1 免疫组化结果 (Envision 染色, $\times 400$)

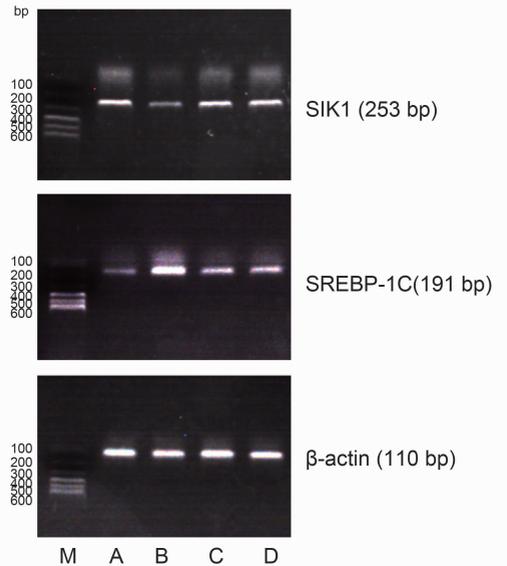
统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,贞清方组和二甲双胍组肝脏 SIK1 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);与二甲双胍组比较,贞清方组肝脏 SIK1 蛋白表达升高,且细胞核有表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

7 各组大鼠肝组织中 SIK1 及 SREBP-1c mRNA 表达水平比较(表 6,图 3) 与正常对照组比较,模型组 SIK1 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$),SREBP-1c 表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,贞清方组和二甲双胍组 SIK1 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$),SREBP-1c 表达显著降低($P < 0.01$);与二甲双胍组比较,贞清方组肝脏 SIK1 的 mRNA 表达显著升高,SREBP-1c 表达显著降低(均 $P < 0.05$)。

表 6 各组大鼠肝组织 SIK1 及 SREBP-1c mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SIK1	SREBP-1c
正常对照	8	0.62 ± 0.05	0.46 ± 0.07
模型	6	0.36 ± 0.08 *	1.42 ± 0.18 *
贞清方	6	0.88 ± 0.09 $\Delta\Delta$	0.87 ± 0.12 $\Delta\Delta$
二甲双胍	6	0.67 ± 0.07 Δ	1.04 ± 0.06 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$;下表同



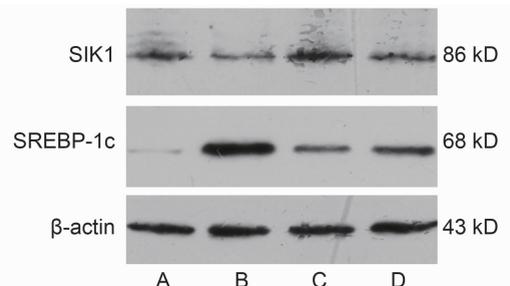
注:M 为 Marker, A 为正常对照组;B 为模型组;C 为贞清方组;D 为二甲双胍组

图 3 各组大鼠肝组织 SIK1 及 SREBP-1c mRNA 表达电泳图

8 各组大鼠肝组织 SIK1 及 SREBP-1c 蛋白表达比较(表 7,图 4) 与正常对照组比较,模型组 SIK1 蛋白表达水平降低显著($P < 0.01$),SREBP-1c 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,贞清方组和二甲双胍组 SIK1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),SREBP-1c 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);与二甲双胍组比较,贞清方组肝脏 SIK1 的蛋白表达显著升高,而 SREBP-1c 表达下降($P < 0.05$)。

表 7 各组大鼠肝组织 SIK1、SREBP-1c 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SIK1/ β -actin	SREBP-1c/ β -actin
正常对照	8	0.74 ± 0.17	0.33 ± 0.05
模型	6	0.56 ± 0.08 *	1.13 ± 0.16 *
贞清方	6	1.02 ± 0.11 $\Delta\Delta$	0.74 ± 0.07 $\Delta\Delta$
二甲双胍	6	0.71 ± 0.09 Δ	0.87 ± 0.13 Δ



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为贞清方组;D 为二甲双胍组

图 4 各组大鼠肝组织 SIK1 和 SREBP-1c 蛋白表达电泳图

讨 论

贞清方是笔者在临床上治疗糖尿病的一个经验方,有很好的降糖降脂作用,前期研究发现,贞清方能改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗^[12],对糖尿病大鼠肾脏有保护作用^[13]。本实验进一步研究贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用及可能作用机制。

前期实验显示应用高糖高脂饮食结合小剂量 STZ 腹腔注射建立的 2 型糖尿病大鼠模型会并发非酒精性脂肪肝^[14],这与其他研究者的报道一致^[15]。本研究也成功建立 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝模型,进一步研究贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用。贞清方灌胃治疗 12 周后,糖尿病大鼠血糖、血脂水平显著降低,肝功能有好转;另外,肝湿重、肝重指数和肝脏 TG 含量明显减少,HE 染色显示肝脏脂肪变性减轻,表明贞清方能有效降低 2 型糖尿病大鼠的血糖、血脂,减轻糖尿病大鼠的非酒精性脂肪肝病变。

糖脂代谢紊乱在 2 型糖尿病患者并发非酒精性脂肪肝的发生发展中发挥着重要作用^[16],SIK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在肝组织中表达升高可抑制空腹糖异生,而过表达 SIK1 可使转基因糖尿病小鼠(db/db)空腹血糖恢复正常^[17]。最新研究发现 SIK1 能影响 SREBP-1c 的表达而调节肝脏脂质合成,小鼠肝脏过表达 SIK1 抑制生脂基因的表达和肝 TG 的积累;反之,特异性下调肝脏 SIK1 的表达可导致 SREBP-1c 目的基因的表达增强^[7,18]。本实验结果显示 SIK1 mRNA 和蛋白在模型组大鼠肝脏的表达低于正常组,而肝脏 SREBP-1c mRNA 和蛋白在模型组的表达高于正常组,且模型组大鼠肝脏 TG 含量比正常组高,这与体外研究特异性下调肝脏 SIK1 的表达引起 SREBP-1c 目的基因的表达增强而导致肝脏脂质合成增多是一致的^[7]。本实验结果进一步证实,SIK1 是调节内生性脂肪酸合成基因表达的关键,即 SIK1 影响 SREBP-1c 的表达而调控肝脏脂质代谢。因此,可通过 SIK1 通路来控制 SREBP-1c 的表达,即用药物上调 SIK1 来调节糖尿病患者非酒精性脂肪肝的肝脏脂质代谢。本实验显示糖尿病大鼠给予贞清方治疗后,糖尿病大鼠肝脏 SIK1 mRNA 和蛋白的表达升高,肝脏 SREBP-1c mRNA 和蛋白的表达降低,肝重指数和肝脏 TG 含量降低明显。本文第一次报道实验性 2 型糖尿病大鼠 SIK1 的表达降低,贞清方能上调肝脏 SIK1 表达,从而抑制 SREBP-1c 表达,改善 2 型糖尿

病大鼠肝脏脂质代谢。

二甲双胍是临床上治疗 2 型糖尿病的一线药物,主要通过改善肝脏胰岛素抵抗,抑制肝脏糖原异生,降低肝糖输出达到降糖效果^[19]。有研究显示二甲双胍对非酒精性脂肪肝有治疗作用^[20],可能是通过 LKB1 信号通路参与调节 AMPK 的激活^[21],而 SIK1 属于 AMPK 家族。本实验结果显示二甲双胍降低 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂水平和肝脏 TG 含量,上调肝脏 SIK1 mRNA 和蛋白的表达,降低肝脏 SREBP-1c mRNA 和蛋白表达,说明二甲双胍也能上调肝脏 SIK1 的表达,对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病变有治疗作用。但贞清方组与二甲双胍组比较,血糖、血脂水平和肝脏 TG 含量降低更明显,肝脏 SIK1 mRNA 和蛋白的表达更高,肝脏 SREBP-1c mRNA 和蛋白表达更低,说明贞清方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病变有更好的治疗作用。但免疫组化显示 SIK1 蛋白在贞清方组肝脏中细胞核也有表达,其具体机制有待于进一步研究。

总之,贞清方能显著降低血糖血脂,改善肝功能,减轻 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病变,其机制与其上调肝脏 SIK1,而 SIK1 抑制 SREBP-1c 的表达,调控肝脏脂质代谢有关。

参 考 文 献

- [1] Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management [J]. *Lancet*, 2011, 378 (9786): 169 - 181.
- [2] Brindisi MC, Guiu B, Duvillard L, et al. Liver fat content is associated with an increase in cholesterol synthesis independent of statin therapy use in patients with type 2 diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(2): 465 - 468.
- [3] Rafiq N, Younossi ZM. Effects of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, 28(4): 427 - 433.
- [4] Williamson RM, Price JF, Glancy S, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(5): 1139 - 1144.
- [5] Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, et al. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector [J]. *Cell*, 2004, 119(1): 61 - 74.
- [6] Katoh Y, Takemori H, Min L, et al. Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element-bind-

- ing protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(21): 4307-4319.
- [7] Yoon YS, Seo WY, Lee MW, et al. Salt-inducible kinase regulates hepatic lipogenesis by controlling SREBP-1c phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(16): 10446-10452.
- [8] Yamamoto T, Watanabe K, Inoue N, et al. Protein kinase C β mediates hepatic induction of sterol-regulatory element binding protein-1c by insulin[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(7): 1859-1870.
- [9] Yahagi N, Shimano H, Hastay A, et al. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35840-35844.
- [10] 沈均, 高书荣, 梁爱宝. 补肾健脾化痰方治疗 2 型糖尿病并非酒精性脂肪肝病的临床研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2012, 20(7): 1671-1678.
- [11] Wen XY, Zeng YL, Liu LF, et al. Zhenqing Recipe alleviates diabetic nephropathy in experimental type 2 diabetic rats through suppression of SREBP-1c[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142: 144-150.
- [12] Huang W, Yu J, Jia X, et al. Zhenqing Recipe improves glucose metabolism and insulin sensitivity by repressing hepatic FoxO1 in type 2 diabetic rats[J]. *Am J Chin Med*, 2012, 40(4): 721-733.
- [13] 刘丽方, 文秀英, 许明旺, 等. 贞清方与地龙对 2 型糖尿病大鼠肾组织 TGF- β 及 PAI-1 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(7): 967-972.
- [14] 罗琼, 文秀英, 鲁敏, 等. 贞清方对 2 型糖尿病并非酒精性脂肪肝大鼠 LX R α 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(14): 1394-1401.
- [15] 李旋珠, 熊洪艳, 林青. 强胰降糖胶囊对糖尿病模型大鼠的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(12): 1109-1111.
- [16] Chen ZH, Xia CD, Huan JN. Analysis on associated risk factors and syndrome types in diabetes mellitus type 2 patients complicated with non-alcoholic fatty liver[J]. *Chin J Integr Tradit Chin Med*, 2008, 28(10): 879-881.
- [17] Koo SH, Flechner L, Qi L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism[J]. *Nature*, 2005, 437(7062): 1109-1111.
- [18] Dentin R, Liu Y, Koo SH, et al. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2[J]. *Nature*, 2007, 449(7160): 366-369.
- [19] Phielix E, Szendroedi J, Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(10): 607-616.
- [20] Hajiaghahmohammadi AA, Ziaee A, Oveisi S, et al. Effects of Metformin, Pioglitazone, and Silymarin treatment on non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled pilot study[J]. *Hepatol Mon*, 2012, 12(8): e6099.
- [21] Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin[J]. *Science*, 2005, 310(5754): 1642-1646.

(收稿:2013-04-21 修回:2014-03-31)

全国西医学习中医班(西苑班)招生通知

中国中医科学院西苑医院系集医疗、科研、教学于一体的三级甲等中医医院,自 1956 年开始,受中华人民共和国卫生部委托,开办“全国西医学习中医班”,为国内外培养了大批中西医结合骨干。现第十七期“全国西医学习中医班”开始招生,将于 2014 年 9 月正式开学。本班学制二年(全日制),由长期从事临床并具有多年教学经验的专家系统讲授 15 门中医课程,一年理论课,一年在本院临床实习。课程考试和实习合格者颁发中国中医科学院西医学习中医班毕业证书。西医院校毕业的医务人员及中医药工作者均可报名参加。欲报名者请向西苑医院教育处函索招生简章,也可通过中国中医科学院西苑医院网下载招生简章和报名表。通讯处:北京海淀区中国中医科学院西苑医院教育处,邮编:100091,电话:(010)62887973 或 62835037,网址:www.xyhospital.com