

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.017.html

◇ 药学研究 ◇

黄芪甲苷对糖尿病大鼠肝损伤保护作用及其机制研究

徐源¹, 黄存东¹, 李竹青¹, 李卫平^{1,2}

摘要 目的 探讨黄芪甲苷(AS-IV)对糖尿病大鼠肝损伤的保护作用及其可能机制。方法 采用腹腔注射链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠模型。将造模成功的糖尿病大鼠随机分为对照组、模型组、罗格列酮组(1.25 mg/kg)、AS-IV组(20、40、80 mg/kg)。连续灌胃给药6周,于给药前测空腹血糖,处死,取肝脏,称肝湿重,计算肝脏指数;采用ELISA法测定各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性;试剂盒检测肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和丙二醛(MDA)含量变化;HE染色观察肝组织病理形态学变化;免疫组化法检测肝脏组织中胰岛素受体底物2(IRS-2)的表达;Western blot法检测磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)和葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)的表达水平。结果 与对照组相比,模型组大鼠肝脏指数、空腹血糖、空腹血清胰岛素、血清AST、ALT、三酰甘油、总胆固醇、高密度脂蛋白水平、肝脏组织中MDA含量均明显升高($P < 0.01$),T-SOD与GSH-Px降低($P < 0.01$),肝病理损伤明显,同时肝组织中IRS-2、PI3K、p-AKT、GLUT4蛋白表达减少。与模型组相比,AS-IV(20、40、80 mg/kg)组能明显改善上述指标的变化,使肝组织损伤减轻,并增加IRS-2、PI3K、p-AKT、GLUT4蛋白表达。结论 AS-IV对糖尿病大鼠肝损伤有保护作用,其机制可能与抗氧化、上调肝脏PI3K/AKT信号通路有关。

关键词 黄芪甲苷;糖尿病;肝脏;PI3K/AKT信号通路

中图分类号 R 587.1;R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1823-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.017

糖尿病是一种以慢性高血糖为主要特征的代谢紊乱综合征,可导致全身多个器官的损害,肝损伤就是其中之一。高血糖是引起糖尿病肝损伤的主要原

因之一。研究^[1]表明糖尿病肝损伤时出现非酒精性脂肪肝是2型糖尿病(T2DM)最常见的慢性肝病,而1型糖尿病(T1DM)也同样能增加慢性肝损伤,其中就包括和T2DM类似的非酒精性脂肪肝改变,以及其他特殊类型的肝损伤。目前推测糖尿病肝损伤与胰岛素抵抗、氧化应激和内质网应激有关^[2]。

黄芪甲苷(astrological IV, AS-IV)是从中药黄芪中提取皂苷的一种有效生物学活性成分,具有抗糖尿病、抗纤维化、抗炎、抗氧化应激、免疫调节和心脏保护等多种药理作用^[3]。前期研究^[4]证实,AS-IV通过降低糖尿病大鼠血糖水平,提高抗氧化能力发挥对实验性糖尿病模型动物心肌的保护作用。目前,关于糖尿病肝损伤的研究较少,其发病机制也尚未明确。该研究通过观察AS-IV对糖尿病大鼠肝组织形态学改变,并测定胰岛素信号转导通路中关键蛋白,如胰岛素受体底物2(insulin receptor substrate 2, IRS-2)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)磷酸化和葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)的表达水平,旨在进一步探讨其对糖尿病大鼠肝脏的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 AS-IV(南京泽朗生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$);盐酸罗格列酮(rosiglitazone, ROG)(江苏黄河药业股份有限公司);链脲佐菌素(美国Sigma公司);柠檬酸、柠檬酸钠(国药集团化学试剂有限公司);羧甲基纤维素钠(美国Sigma-Aldrich公司);兔抗IRS-2、PI3K、p-AKT、GLUT4多克隆抗体(英国Abcam公司);山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗、 β -actin抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(gluta-

2017-08-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173624);安徽省国际合作项目(编号:12030603007);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2016SD35)

作者单位:¹安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

²安庆医药高等专科学校,安庆 246052

作者简介:徐源,男,硕士研究生;

李卫平,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lwp19@126.com

thione peroxidase ,GSH-Px) 活性、丙二醛 (malondialdehyde ,MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 胰岛素放射免疫分析试剂盒 (北京北方生物技术研究所)。

1.1.2 仪器 One Touch Ultra 血糖仪 (美国强生公司); Spectra Max 190 全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); BM-II 型病理组织包埋机 (安徽电子科学研究所); ASP-300 型全自动脱水机、RM2135 型石蜡切片机 (德国莱卡公司); FA1004 电子天平 (上海天平仪器厂)。

1.1.3 动物 雄性 SD 大鼠 60 只, 清洁级, 220 ~ 250 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。在温度控制在 20 ~ 25 °C、湿度 40% ~ 70%、12 h 昼夜节律、每笼 5 只的环境下适应性饲养 1 周后进行实验。试验期间普通饲料喂养, 所有动物自由摄食, 进水。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的制备、分组与给药 采用一次性腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素溶液 (用 pH 4.2 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液溶解, 现配现用, 保证在 30 min 内注射完毕)。72 h 后, 尾静脉取血测空腹血糖 (fasting blood glucose ,FBG), FBG \geq 11.1 mmol/L 确定为糖尿病造模成功大鼠。将造模成功的大鼠随机分为模型组、AS-IV 组 (20、40 和 80 mg/kg) 和 ROG 组 (1.25 mg/kg) 另设对照组, 每组 8 只。各组药物均用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液溶解, 对照组和模型组给予等体积溶媒, 每天灌胃给药一次, 治疗 6 周。

1.2.2 标本收集 治疗 6 周后收集标本。大鼠空腹 12 h 后, 尾静脉取血测 FBG; 在 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 体重剂量腹腔注射麻醉下行腹主动脉插管收集血标本, 4 °C、1 500 r/min 离心 15 min, 取血浆保存在 -20 °C 待测 AST、ALT、三酰甘油 (tri-glyceride ,TG)、总胆固醇 (total cholesterol ,TC)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein ,HDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein ,LDL)、空腹血清胰岛素 (fasting insulin ,FINS) 水平。通过腹主动脉插管注入 4 °C 的生理盐水, 反复灌注直到肝脏颜色变为苍白后取出肝脏, 置于冰上, 取部分肝组织待测 T-SOD、GSH-Px、MDA 试剂盒; 取 8 mm \times 8 mm 大小肝组织置于 10% 中性福尔马林溶液中固定, 常规脱水、浸蜡、包埋, 制成 4 μ m 厚的切片, 用于 HE 染色及免疫组化检测; 剩余肝组织迅速存放于 -80 °C 冰箱, 用于 Western blot 试验。

1.2.3 空腹血糖及胰岛素水平检测 各组大鼠分

别于给药时和给药第 6 周, 用 One Touch Ultra 血糖仪测定各组大鼠空腹血糖; 放射免疫法测定 FINS 水平, 然后计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment ,HOMA-IR) = (FINS \times FBG /22.5)、胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index ,ISI) = LN (1/FBG \times FINS)。

1.2.4 体重、肝重、肝脏指数、ALT、AST、TG、TC、LDL、HDL 的测定 分离摘取肝脏组织, 用滤纸吸干肝脏表面的血液后称重, 计算肝重指数 [肝重 (g) / 体重 (g) \times 100%]; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 ALT 和 AST 活性; 全自动生化分析仪测定血清 TG、TC、LDL、HDL 水平。

1.2.5 肝脏组织中 T-SOD、MDA、GSH-Px 含量测定 采血完毕后, 取出肝脏组织, 用生理盐水冲洗干净, 剪碎加入裂解液进行手动匀浆, 制备 10% 肝匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 严格按照试剂盒说明书步骤进行操作, 用紫外-可见分光光度计平行测定各组大鼠肝脏组织中 T-SOD、GSH-Px 和 MDA 含量。

1.2.6 肝脏组织病理学改变观察 取肝左叶部分组织置于 10% 中性福尔马林溶液中固定、乙醇脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察。

1.2.7 免疫组织化学法检测肝脏 IRS-2 蛋白表达 上述石蜡切片严格按照免疫组化试剂盒说明书操作。用自动图像分析系统进行半定量扫描分析, 以阳性表达信号单位面积平均颜色强度为指标, 每个切片由左向右取 6 个视野, 取其平均光密度值作为量化的指标, 进行统计学分析。

1.2.8 Western blot 法检测肝脏组织 PI3K、p-AKT、GLUT4 蛋白表达 取大鼠肝脏组织, 提取总蛋白, BCA 法蛋白定量, 电泳并湿转至 PVDF 膜上。在室温条件下用 5% 的脱脂奶粉将膜封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 分别加入到 IRS-2、PI3K、p-AKT、GLUT4 和 β -actin 一抗稀释液中, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 加 ELC 显色, 发光, 用 Image 图像分析软件进行条带分析, 检测条带的平均光强度。计算目的条带和 β -actin 的比值, 值越大说明蛋白表达越多。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。各实验均独立重复 3 次, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV 对糖尿病大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR

表1 AS-IV对糖尿病大鼠FBG、FINS、HOMA-IR和ISI的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	FBG (mmol/L)	FINS (nmol/L)	HOMA-IR	ISI
对照	5.20 ± 0.36	23.57 ± 4.21	5.72 ± 1.20	-4.84 ± 0.21
模型	18.45 ± 2.70**	76.07 ± 13.51**	57.89 ± 12.27**	-7.15 ± 0.21**
AS-IV (mg/kg)				
20	14.05 ± 2.45 [#]	61.42 ± 14.68 [#]	37.23 ± 9.89 ^{##}	-6.70 ± 0.27 ^{##}
40	11.78 ± 1.71 ^{##}	48.30 ± 9.76 ^{##}	24.86 ± 9.08 ^{##}	-6.26 ± 0.42 ^{##}
80	10.58 ± 2.37 ^{##}	34.95 ± 6.36 ^{##}	16.22 ± 3.61 ^{##}	-5.88 ± 0.22 ^{##}
ROG (1.25 mg/kg)	11.55 ± 2.99 ^{##}	96.34 ± 15.80 [#]	48.79 ± 11.33	-6.98 ± 0.25

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 表2 AS-IV对糖尿病大鼠体重、肝重、肝功能及血脂的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目	对照组	模型组	AS-IV (20 mg/kg)	AS-IV (40 mg/kg)	AS-IV (80 mg/kg)	ROG (1.25 mg/kg)
体重 (g)	436.24 ± 49.94	345.82 ± 28.93**	370.38 ± 22.31	385.35 ± 35.19 [#]	400.73 ± 28.58 ^{##}	408.46 ± 39.75 ^{##}
肝重 (g/100 g)	2.53 ± 0.16	3.97 ± 0.46**	3.42 ± 0.28 [#]	3.16 ± 0.12 ^{##}	2.99 ± 0.19 ^{##}	3.29 ± 0.48 ^{##}
ALT (U/L)	44.67 ± 7.12	74.84 ± 19.85**	66.16 ± 5.12	50.17 ± 10.21 [#]	49.50 ± 8.96 ^{##}	58.33 ± 15.64 [#]
AST (U/L)	73.67 ± 13.46	133.83 ± 18.45**	110.33 ± 15.56 [#]	102.17 ± 21.21 ^{##}	80.17 ± 15.89 ^{##}	107.83 ± 20.61 [#]
TG (mmol/L)	0.46 ± 0.18	3.86 ± 0.57**	1.90 ± 0.61 ^{##}	1.24 ± 0.41 ^{##}	1.03 ± 0.19 ^{##}	1.96 ± 0.52 ^{##}
TC (mmol/L)	1.54 ± 0.39	2.67 ± 0.43**	1.91 ± 0.16 ^{##}	1.81 ± 0.18 ^{##}	1.78 ± 0.21 ^{##}	1.96 ± 0.20 ^{##}
HDL (μmol/L)	1.46 ± 0.20	1.07 ± 0.16**	1.12 ± 0.14	1.17 ± 0.13	1.30 ± 0.12 ^{##}	1.13 ± 0.13
LDL (mmol/L)	0.34 ± 0.09	0.37 ± 0.10	0.30 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.08	0.31 ± 0.05

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

和 ISI 的影响 与对照组相比,模型组大鼠血中 FBG、FINS、HOMA-IR 均明显升高,ISI 明显降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,AS-IV 给药组和 ROG 组 FBG、FINS、HOMA-IR 均明显降低 ($F = 9.649, 20.587, 18.348, P < 0.01$),ISI 明显升高 ($F = 20.403, P < 0.01$),提示 AS-IV 能明显改善糖尿病大鼠的高血糖状态和胰岛素抵抗。见表 1。

2.2 AS-IV 对糖尿病大鼠体重、肝重、肝功能及血脂含量的影响 与对照组相比,模型组大鼠肝重、血清 ALT、AST、TG 和 TC 均明显升高 ($P < 0.01$),而 HDL 和体重明显降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,AS-IV (40、80 mg/kg) 组和 ROG 1.25 mg/kg 组肝重、血清 ALT、AST、TG、TC 含量均有不同程度的降低 ($F = 7.839, 3.870, 6.631, 32.038, 15.506, P < 0.01$),体重和 HDL 明显增加 ($F = 3.785, P < 0.01, F = 3.254, P < 0.05$),而 AS-IV 对 LDL 水平无明显影响。见表 2。

2.3 AS-IV 对糖尿病大鼠肝脏组织中 T-SOD、MDA、GSH-Px 含量的影响 与对照组比较,模型组糖尿病大鼠肝脏 T-SOD 和 GSH-Px 含量显著降低,MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,AS-IV (40、80 mg/kg) 和 ROG 1.25 mg/kg 组肝组织中 T-SOD 和 GSH-Px 含量显著增加 ($F = 17.86, 4.769, P < 0.01$),MDA 含量显著降低 ($F = 15.484, P < 0.01$),见表 3。

表3 AS-IV对糖尿病大鼠肝脏组织中T-SOD、MDA、GSH-Px含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	T-SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)
对照	215.34 ± 22.99	4.65 ± 1.25	52.21 ± 8.01
模型	102.25 ± 28.73**	11.81 ± 2.21**	29.36 ± 8.96**
AS-IV (mg/kg)			
20	133.14 ± 24.79	9.26 ± 2.51	34.73 ± 6.54
40	149.11 ± 35.42 [#]	8.18 ± 2.12 [#]	41.29 ± 9.32 [#]
80	184.49 ± 21.94 ^{##}	7.33 ± 1.85 ^{##}	50.29 ± 10.92 ^{##}
ROG (1.25 mg/kg)	151.80 ± 22.09 [#]	8.05 ± 1.94 ^{##}	47.36 ± 7.88 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.4 AS-IV 对糖尿病大鼠肝脏病理组织形态学变化的影响 HE 染色结果显示,对照组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞呈放射状规则排列,无变性、坏死及炎性细胞浸润。模型组肝细胞索结构紊乱,可见明显的肝细胞肿胀,变性、坏死,局部有炎症细胞浸润。与模型组相比,AS-IV (20、40、80 mg/kg) 组能不同程度减轻大鼠肝脏病理改变,特别是 AS-IV 80 mg/kg 和 ROG 1.25 mg/kg 组,可明显改善大鼠肝细胞损伤状态。见图 1。

2.5 AS-IV 对糖尿病大鼠肝脏 IRS-2 蛋白表达的影响 如图 2 所示:IRS-2 阳性染色颗粒呈黄褐色,定位于胞质,对照组肝脏 IRS-2 大量表达,模型组肝脏 IRS-2 表达明显减少,AS-IV (20、40、80 mg/kg) 组 IRS-2 的蛋白表达有升高作用,AS-IV 80 mg/kg 组作用更明显 (图 2E)。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像

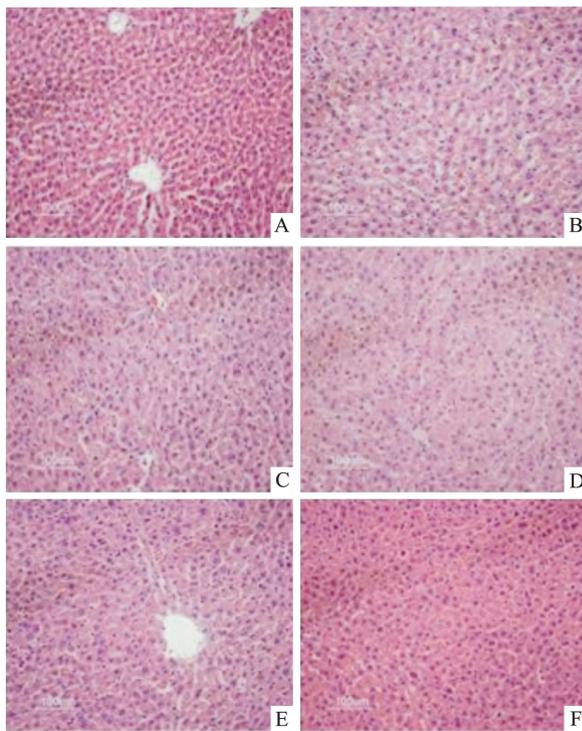


图1 肝脏 HE 染色结果 ×100

A:对照组; B:模型组; C:AS-IV 20 mg/kg 组; D:AS-IV 40 mg/kg 组; E:AS-IV 80 mg/kg 组; F:ROG 1.25 mg/kg 组

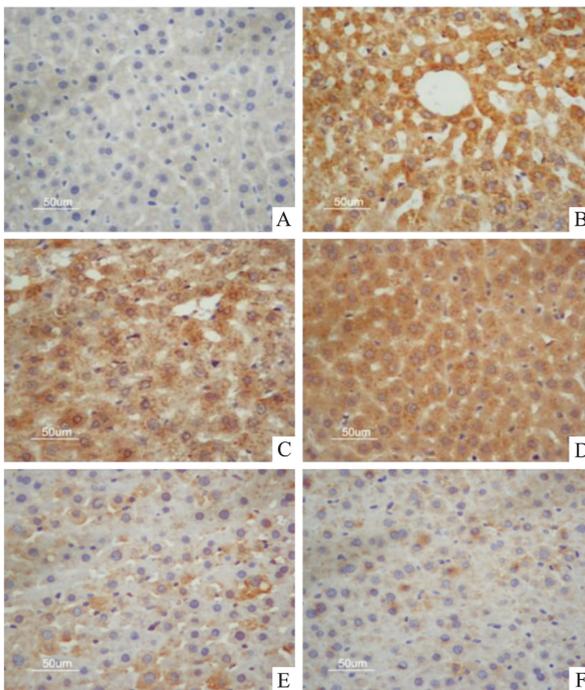


图2 免疫组化法检测大鼠肝脏中 IRS-2 蛋白表达 LSAB ×50

A:对照组; B:模型组; C:AS-IV 20 mg/kg 组; D:AS-IV 40 mg/kg 组; E:AS-IV 80 mg/kg 组; F:ROG 1.25 mg/kg 组

分析软件半定量检测各组 IRS-2 蛋白含量,用平均吸光度值表示。结果显示,对照组免疫组化平均光密度值明显高于模型组 (0.2976 ± 0.0321 vs 0.0865 ± 0.0087 , $P < 0.01$); AS-IV (20、40、80 mg/kg) 和 ROG 1.25 mg/kg 组肝组织中 IRS-2 表达明显高于模型组 (0.1054 ± 0.0093 vs 0.1732 ± 0.0181 vs 0.2004 ± 0.0209 vs 0.2237 ± 0.0248 vs 0.0865 ± 0.0087 , $F = 57.942$, $P < 0.01$) ,差异有统计学意义。

2.6 AS-IV 对各组大鼠肝组织中 PI3K、p-AKT、GLUT4 蛋白表达的影响 Western blot 法结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏组织中 PI3K p85、p-AKT、GLUT4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,AS-IV (20、40、80 mg/kg) 和 ROG 1.25 mg/kg 组大鼠肝脏组织中 PI3K p85、p-AKT、GLUT4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图3。

3 讨论

肝损伤是糖尿病常见的慢性并发症之一,肝脏作为胰岛素作用的主要靶器官,在葡萄糖和脂质代谢调节过程起非常重要的作用^[5]。研究^[6]显示糖尿病通过影响糖原和脂质代谢,导致肝脏结构性和功能异常。当糖尿病合并肝损伤时,肝脏出现糖脂代谢紊乱、脂肪变性进而加重肝细胞损伤,从而影响胰岛素在外周的利用,使血糖进一步升高,并由此形成恶性循环。因此,降低糖尿病患者血液葡萄糖水平是改善肝脏脂肪变性等病理形态学变化的有效方式。在本实验中,AS-IV 能够调节糖尿病肝脏中糖脂代谢,预防脂质积聚,减少 TC、TG 和脂肪沉积,改善脂肪变性,减轻糖尿病引起的肝损伤。

糖尿病大鼠出现明显的肝损伤,主要表现在 ALT 和 AST 的增加,扰乱大鼠肝重和体重比,通过 HE 染色确认糖尿病大鼠存在肝损伤。血清 ALT 和 AST 活性的增加被认为是肝细胞功能障碍肝胰岛素敏感性降低^[7]。本实验研究显示,糖尿病大鼠血清 ALT 和 AST 活性水平明显升高,给予 AS-IV 干预后,可以降低 ALT 和 AST 活性,从而减轻肝损伤。

研究^[8]显示脂质过氧化是参与氧化应激诱导的细胞损伤的基本机制之一。在肝脏中,其是肝细胞膜损伤的早期特征,随后增加的肝毒性向血液循环中释放。AS-IV 增加糖尿病大鼠循环和抗氧化能力,显著降低糖尿病大鼠的 TC、TG、HDL、MDA 含

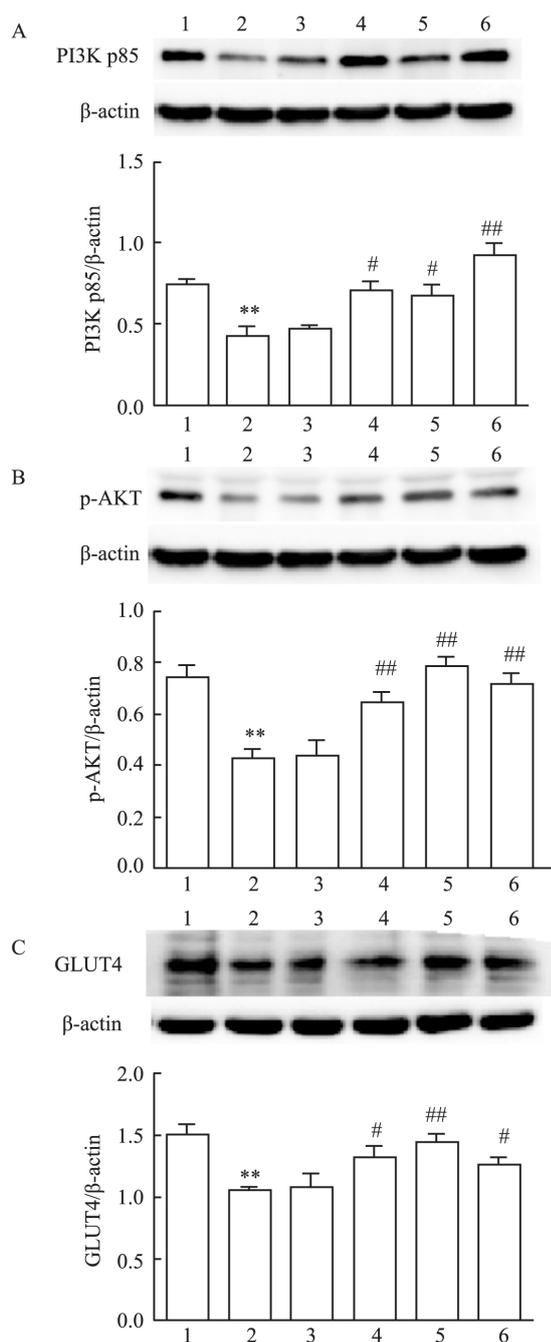


图3 通过 Western blot 法观察 AS-IV 对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肝脏 PI3K/AKT 信号通路的影响

A: PI3K p85 蛋白的表达; B: p-AKT 蛋白的表达; C: GLUT 4 蛋白的表达; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: AS-IV 20 mg/kg 组; 4: AS-IV 40 mg/kg 组; 5: AS-IV 80 mg/kg 组; 6: ROG 1.25 mg/kg 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

量 升高肝脏 T-SOD、GSH-Px 活力, 表明 AS-IV 可降低大鼠血脂和脂质沉积, 提高肝脏抗氧化能力, 具有保护肝脏的作用。此外, 通过对糖尿病肝脏病理形态学观察显示 AS-IV 改善肝肿大, 减轻肝细胞肿胀、炎症浸润、变性坏死, 改善肝组织学, 因此, AS-IV 作

为抗氧化剂可能具有在高血糖环境中对肝损伤保护的作用。

PI3K/AKT 信号传导途径是肝脏胰岛素信号传导中的主要通路, 参与了体内糖代谢的生理机制^[9]。活化的胰岛素受体使胰岛素受体底物的酪氨酸位点 -1/2 磷酸化后(肝脏的胰岛素代谢作用主要是由于 IRS-2), 然后激活 PI3K; 活化的 PI3K 可催化 4,5-二磷酸酰肌醇磷酸(PIP₂) 并产生 PIP₃, 其可作为第二信使激活 Akt, 并且活化的 Akt 通过调节发挥代谢生物学作用下游分子。正常生理状态下, 胰岛素与胰岛素受体结合, 导致下游 IRS-1、IRS-2 等不同底物的磷酸化, 进而启动胰岛素信号通路, 调节下游分子产生生物效应和维持血糖平衡^[10]。因此, 任何沿 PI3K/AKT 信号通路出现异常都会影响胰岛素信号的转导, 导致葡萄糖转运和代谢的异常, 促进胰岛素抵抗发展以及糖尿病的发生。

Norquay et al^[11] 研究表明, IRS-2 水平增加可促进胰岛 β 细胞的生长, 提高其功能并维持其生存, 从而改善胰岛素抵抗。Hennige et al^[12] 发现增加 IRS-2 的表达可以促进 β 细胞存活和免于糖尿病。研究^[13] 显示敲除 IRS-2 基因的大鼠表现为外周胰岛素抵抗和 β 细胞功能障碍, 出现严重的糖尿病症状。研究结果都证实 IRS-2 增加将促进 β 细胞的生存和功能, 对改善胰岛素抵抗及糖尿病具有积极的影响。本研究利用免疫组化法检测不同组大鼠肝脏组织中 IRS-2 蛋白的表达, 结果显示模型组 IRS-2 表达明显减少, AS-IV 各给药组 IRS-2 表达明显增加, 提示 AS-IV 通过增加 IRS-2 蛋白的表达增加胰岛素敏感性, 减轻胰岛素抵抗, 发挥对糖尿病肝损伤的保护作用。

最近的研究^[14] 显示大鼠肝细胞 PI3K 的 p85 亚基在糖尿病中表达明显下降。激活的 PI3K-Akt 的磷酸化水平指标主要反映 Akt 通路的活性, 其中 Akt Ser473 是 Akt 在 PI3K 被激活后形成磷酸化的主要形式。在糖尿病状态下, Akt Ser473 的磷酸化水平降低, 胰岛素信号转导下沉^[15]。因此, 为进一步探讨 AS-IV 对糖尿病肝损伤保护作用的机制, 本研究观察了糖尿病肝组织中胰岛素受体后 PI3K/AKT 信号传导途径相关蛋白的表达, 结果显示 PI3K、p-AKT、GLUT4 表达明显降低, 糖尿病大鼠给予 AS-IV 治疗 6 周后, PI3K p85、p-AKT、GLUT4 蛋白的表达明显上调, 同时氧化应激水平也明显改善, 表明 PI3K/AKT 信号通路可能参与了糖尿病肝损伤过程中脂肪肝的发生及机体氧化应激损伤程度, 提示

AS-IV可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路,改善胰岛素抵抗和刺激肝脏中葡萄糖摄取,并减轻由链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肝脏中的氧化应激使血糖恢复到正常水平,进而达到对损伤组织保护作用,从而减轻肝损伤程度。但其确切机制仍需要通过进一步研究来阐明。

综上所述,AS-IV可以降低血清葡萄糖水平,改善血脂,减轻氧化应激和肝脏组织病理形态学损伤,对糖尿病大鼠肝损伤具有明显的保护作用,其作用机制可能与抗氧化,减轻肝脏中氧化应激损伤,上调 PI3K/AKT 信号通路,改善胰岛素抵抗有关。

参考文献

- [1] Kim J Y, Lee S H, Song E H, et al. A critical role of STAT1 in streptozotocin-induced diabetic liver injury in mice: controlled by ATF3 [J]. *Cell Signal* 2009, 21(12): 1758–67.
- [2] Wan Y, Garner J, Wu N, et al. Role of stem cells during diabetic liver injury [J]. *J Cell Mol Med* 2016, 20(2): 195–203.
- [3] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. *J Tradit Chin Med* 2013, 33(3): 413–6.
- [4] 韩佳, 李卫平, 栾家杰, 等. 黄芪总苷对实验性糖尿病小鼠心肌保护作用的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47(3): 290–4.
- [5] Jones J G. Hepatic glucose and lipid metabolism [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(6): 1098–103.
- [6] Wang K, Tang Z, Zheng Z, et al. Protective effects of Angelica sinensis polysaccharide against hyperglycemia and liver injury in multiple low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic BALB/c mice [J]. *Food Funct*, 2016, 7(12): 4889–97.
- [7] Tian F, Zhang Y J, Li Y, et al. Celecoxib ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetic rats via suppression of the non-canonical Wnt signaling pathway expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e83819.
- [8] Gasparotto J, Somensi N, Bortolin R C, et al. Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters *in vitro* and *ex vivo* [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2014, 55(2): 110–9.
- [9] Beale E G. Insulin signaling and insulin resistance [J]. *J Investig Med* 2013, 61(1): 11–4.
- [10] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3): 829–38.
- [11] Norquay L D, D'Aquino K E, Opare-Addo L M, et al. Insulin receptor substrate-2 in beta-cells decreases diabetes in nonobese diabetic mice [J]. *Endocrinology* 2009, 150(10): 4531–40.
- [12] Hennige A M, Burks D J, Ozcan U, et al. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic cells prevents diabetes [J]. *J Clin Invest* 2003, 112(10): 1521–32.
- [13] Burks D J, White M F. IRS proteins and beta-cell function [J]. *Diabetes*, 2001, 50 Suppl 1: S140–5.
- [14] Li S, Chen H, Wang J, et al. Involvement of the PI3K/Akt signal pathway in the hypoglycemic effects of teapolsaccharides on diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 967–74.
- [15] Bozulis L, Hemmings B A. PI3K on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation [J]. *Curr Opin Cell Biol* 2009, 21(2): 256–61.

Protective effects of astragaloside IV on liver injury in diabetic rats and its mechanism

Xu Yuan, Huang Cundong, Li Zhuqing, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the protective effect of astragaloside IV (AS-IV) on liver injury in diabetic rats and its potential mechanism. **Methods** Diabetic rats model was established by intraperitoneally injecting streptozotocin. The diabetic rats were randomly divided into control group, model group, rosiglitazone group (1.25 mg/kg) and AS-IV groups (20, 40, 80 mg/kg). Intra-gastric administration for 6 weeks, measured fasting blood glucose before dosing, then executed the rats, take the liver, weighed the liver wet weight, calculated the liver index. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The active of Glutathione peroxidase (GSH-Px), total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected according to the kit instructions. According to the kit instructions. The pathological changes of liver tissue in rats were observed by hematoxylin and eosin staining. The protein expression level of insulin receptor substrate 2 (IRS-2) in liver tissue was detected by immunohistochemistry method. The protein expression levels of PI3K, p-AKT and GLUT4 by Western blot analysis. **Results** Compared with the normal group, the model group liver index, fasting blood glucose, fasting insulin, serum AST,

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.018.html>

β-葡聚糖抑制大鼠硅肺纤维化损伤的机制研究

王路, 孙悦, 刘嘉祺, 彭子荷, 郝小惠, 徐洪, 刘和亮

摘要 目的 探讨 β-葡聚糖通过对氧化应激的调节抑制大鼠硅肺纤维化的作用及其机制。方法 采用动式染尘法制作大鼠硅肺模型, 实验分组为: 对照组、模型组、β-葡聚糖前处理组、β-葡聚糖后处理组。HE 染色观察肺组织病理形态, 检测各组大鼠肺组织及血清的丙二醛 (MDA) 表达、过氧化氢酶 (CAT) 以及还原型谷胱甘肽 (GSH) 表达; 采用 Western blot 法检测肺组织内 I 型胶原、α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、硫氧还蛋白-1 (TRX-1) 的表达。结果 与对照组相比, 模型组有典型的矽结节形成, α-SMA 阳性染色明显, 而 β-葡聚糖前、后处理组均能够显著抑制大鼠肺纤维化程度。与对照组相比, 模型组肺组织、血清中 MDA 含量明显上调, 而血清中 CAT 及肺组织中 GSH 含量增高, 同时伴有 I 型胶原、α-SMA 蛋白水平的上调和 TRX-1 蛋白水平的下调 ($P < 0.05$); 而予以 β-葡聚糖前处理和后处理, 均能够显著抑制二氧化硅引起的上述病变, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 β-葡聚糖可能通过上调 TRX-1 表达拮抗氧化应激损伤, 从而抑制硅肺纤维化的发生与发展。

关键词 β-葡聚糖; 氧化应激; 硫氧还蛋白-1; 硅肺

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1829-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.018

2017-08-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81673119); 唐山市科技计划项目 (编号: 14160201B); 河北省卫计委医学科学研究项目 (编号: 20160717); 华北理工大学大学生创新项目 (编号: X2016215)

作者单位: 华北理工大学医学实验研究中心、老年医学国际科技合作基地, 唐山 063000

作者简介: 王路, 女, 在读本科生;

刘和亮, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 2498022497@qq.com

硅肺病是我国最严重的职业病, 其发病机制复杂。近来研究^[1-2]显示, 氧化应激损伤在硅肺纤维化发生、发展中起到了重要的调控作用, 可能是治疗硅肺纤维化的一个潜在靶向。β-葡聚糖是许多植物、细菌和真菌细胞壁的主要多糖成分, 具有抗氧化应激损伤、降血脂、降血糖、提高机体免疫力等多种生物活性作用^[3]。研究^[4]表明, β-葡聚糖能有效抑制博来霉素诱导的早期肺纤维化病变, 而对硅肺纤维化是否具有抑制作用还未见报道。该研究拟通过动式染尘构建硅肺大鼠模型, 观察 β-葡聚糖通过对氧化应激损伤的调控, 抑制硅肺大鼠肌成纤维细胞转化和胶原沉积的作用, 为将 β-葡聚糖开发为一种新的抗硅肺纤维化的药物提供一定的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SiO₂ (99% 粒径 < 5 μm)、β-葡聚糖 (β-1,3-Glucan)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX)-1 一抗 (美国 Sigma 公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 试剂盒 (南京建成生物有限公司); α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, SMA) 一抗 (美国 abcam 公司); I 型胶原、GAPDH (武汉博士德生物有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及模型制作 SPF 成年雄性 Wistar 大鼠 40 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 (SCXK 京 2009-0004), 180 ~ 220 g, 于华北理工大学动物实验中心屏障实验室 (SYXK 冀 2010-0038)

ALT, triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein and the content of MDA in liver tissue were significantly increased ($P < 0.01$), T-SOD and GSH-Px were decreased ($P < 0.01$). Liver pathological injury was obvious and the protein expression levels of IRS-2, PI3K, p-AKT, GLUT4 in liver tissue were decreased. Compared with the model group, AS-IV (20, 40, 80 mg/kg) group significantly improved the above indexes, reduced the injury of liver tissue and increased the protein expression levels of IRS-2, PI3K, p-AKT and GLUT4. **Conclusion** AS-IV has protective effect on liver injury in diabetic rats and the mechanism underlying. And the mechanism underlying may be related to anti-oxidative and up-regulation of PI3K / AKT signal pathway in liver.

Key words astragaloside IV; diabetes mellitus; liver; PI3K/AKT signaling pathway