

苦酸通调方对自发性糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白表达的影响[※]

● 米佳* 高胜男 朱浩宇 陈曦 朴春丽[▲]

摘要 目的:观察苦酸通调方对自发性糖尿病大鼠腹部脂肪中脂肪酸生成酶(FAS)蛋白表达的影响。方法:将高脂饲料喂养的雄性 SPF 级 ZDF(Zucker Diabetic Fatty)大鼠随机分为模型组、苦酸通调组、吡格列酮组,普通饲料喂养的雄性 SPF 级 ZL(Zucker Lean)大鼠为正常对照组,每组各 10 只。苦酸通调组按照 $3.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,吡格列酮组按照 $1.07\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,模型组、正常对照组予等体积蒸馏水灌胃,连续 12 周。经 Western blot 法检测各组大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白的表达情况。结果:与正常组比较,模型组 FAS 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);苦酸通调方组及吡格列酮组可明显降低 FAS 蛋白表达,与模型组比较有明显改善($P < 0.01$)。结论:苦酸通调方可明显降低糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白的表达。

关键词 苦酸通调方 2 型糖尿病 胰岛素抵抗 脂肪酸合成酶

糖尿病是一种由多种原因引起的糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱综合征^[1]。随着生活方式的改变,生活水平的提高,糖尿病以其较高的发病率成为严重影响人类健康的问题。胰岛素抵抗及胰岛功能受损是 2 型糖尿病的两个基本环节^[2]。脂肪酸合成酶(FAS)是胆固醇及脂肪酸合成途径中的关键酶之一,在脂肪酸和甘油三酯代谢中发挥着重要作用^[3],是催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成内源性长链脂肪酸的关键酶^[4]。其表达的改变可能是肥胖、2 型糖尿病发生的分子基础之一。本实验研究苦酸通调方对 ZDF 大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白表达情况的影响,进一步研究本方的可能机制。

1 材料

1.1 药物 苦酸通调方(由黄连、乌梅、大黄、干姜 4

味中药组成,由长春中医药大学附属医院颗粒药房提供);吡格列酮(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:国药准字 H20040631)。

1.2 动物 SPF 级 9 周龄雄性 ZDF 大鼠,体重(244 ~ 291)g;SPF 级 9 周龄雄性 ZL 大鼠,体重(183 ~ 220)g,均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证:SCXK(京)2014-0003。大鼠在北京中医药大学基础医学院实验室中饲养,实验室温度 20 ~ 22℃,相对湿度(55 ± 5)%,12/12 小时光照黑暗循环。适应环境 1 周后开始实验。

1.3 试剂 FAS(批号:PW2-3)、抗体(批号:3777R-100)、Anti-FAS(批号:CA1101)、Anti-GAPDH(批号:25007)均购自美国 CST 公司;蛋白裂解液+苯甲基磺酰氟(批号:P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0006)均购自上海碧云天生物技术公司。

1.4 仪器 调节台式高速低温离心机(HERAEUS Fresco 17,Thenno Scientific,USA);温控震荡仪(Thenno Scientific,USA);电泳仪、电泳及电转移装置(PowerPac Basic,Bio-Rad,USA);酶标仪(Model 550 Microplate Reader,Bio-Rad,USA);凝胶图像处理系统(Tanon GIS-1000,上海)。

※基金项目 吉林省自然科学基金项目(No. 201115169)

* 作者简介 米佳,女,医学博士,主治医师。研究方向:中医药治疗内分泌及代谢病的研究。

▲通讯作者 朴春丽,女,医学博士后,主任医师,教授,博士研究生导师。研究方向:中医药治疗内分泌及代谢病的研究。E-mail:pcl2013@sina.cn

• 作者单位 长春中医药大学附属医院(130021)

2 方法

2.1 自发性肥胖2型糖尿病大鼠模型制备 ZDF大鼠予普通饲料适应性喂养1周后,予高脂饲料#5008[购于北京华卓康生物科技股份有限公司,合格证号:SCXK(京)2009-0008,粗脂肪6.5%、粗蛋白23.5%]喂养。大鼠定期行糖耐量实验,试验前禁食不禁水15h,剪尾取血,微量血糖仪测空腹血糖后,予30%葡萄糖溶液按 $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃^[5]。糖负荷后分别在0.5h、1h、1.5h和2h剪尾取血,用血糖仪测量血糖。当血糖峰值高于 $16.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和/或糖负荷后2h高于 $11.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可诊断为糖尿病或糖耐量减低,表明造模成功。

2.2 分组及给药 将造模成功的ZDF大鼠30只随机分为模型组、苦酸通调组、吡格列酮组各10只;10只ZL大鼠为正常对照组。苦酸通调方组按照 $3.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (前期工作已确定的最佳剂量)混悬液灌胃给药^[6];吡格列酮组按照 $1.07\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药;正常对照组和模型组均予等体积蒸馏水灌胃。各组大鼠均连续灌胃12周,每日1次。给药期间正常对照组大鼠饲以普通饲料,其他组饲以高脂饲料,自由进食、饮水,每周称重,根据体重调整灌胃剂量。

2.3 标本采集、制备 给药12周后,将大鼠处死后打开腹腔,迅速取出腹部脂肪组织,把组织剪切成细小的碎片,PMSF与PIPA裂解缓冲液以1:100的比例加入组织中,涡旋振荡,冰浴中用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解,将匀浆液其置于EP管中, 4°C 、13000rpm $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30min,收集中层清液,用于检测FAS蛋白的表达。

2.4 Western blot法检测腹部脂肪组织FAS蛋白的表达 裂解脂肪细胞并匀浆,离心取上清液,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,取样品 $5\mu\text{L}$,SDS-PAGE电泳分离蛋白,转膜,Anti-FAS、Anti-GAPDH抗体稀释液与膜充分接触, 4°C 过夜,TBST中室温脱色,放入二抗稀释液,封闭, 37°C 孵育1h,显影曝光、洗片,扫描仪扫描电泳调带,软件进行光密度值分析。

2.5 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

在治疗第12周末,模型组、吡格列酮组、苦酸通

调组大鼠腹腔脂肪组织中FAS蛋白的表达水平较正常对照组明显升高($P < 0.01$);苦酸通调组和吡格列酮组与模型组相比均明显降低($P < 0.01$),说明苦酸通调方和吡格列酮均能降低糖尿病大鼠腹腔脂肪组织FAS蛋白的表达水平,且苦酸通调组降低幅度大于吡格列酮组($P < 0.05$)。见表1、图1。

表1 各组大鼠腹部脂肪组织中FAS蛋白的表达变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

分组	FAS
正常对照组	0.54 ± 0.03
模型组	$0.96 \pm 0.02^*$
吡格列酮组	$0.74 \pm 0.01^{*\Delta}$
苦酸通调组	$0.67 \pm 0.02^{*\Delta\#}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与吡格列酮组比较,# $P < 0.05$ 。

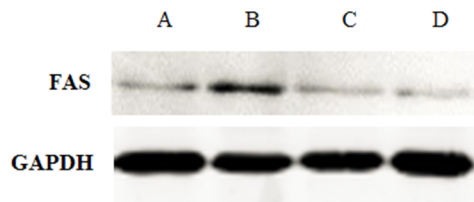


图1 各组大鼠脂肪组织中FAS蛋白的表达(Western blot条带图)

(A. 正常对照组;B. 模型组;C. 吡格列酮组;D. 苦酸通调组)

4 讨论

由于人们生活方式改变和体力活动缺乏的现状,在中国DM的患病率逐年增加,是继肿瘤、心血管疾病之后世界第三大威胁人类健康的疾病。本课题组所在团队经十余年的临床和动物实验研究^[7,8]证实,六郁和络滞并存是导致肥胖2型糖尿病的核心病机。六郁是指以肥甘滋腻之品滞脾碍胃(食郁)为先导而形成的气郁、血郁、热郁、痰郁、湿郁的病理状态;膏、浊、痰、脂、瘀、毒化生,郁滞络脉。络滞是由六郁交互作用而形成络脉郁滞的病理状态。苦酸通调方是以四气五味药性理论设立苦酸通调法,以苦味药为主,与酸味药相配合,由《温病条辨》所记载的连梅汤(黄连、乌梅)加大黄、干姜而成。苦酸通调方按照君臣佐使的组方原则进行药物配伍,以“六郁和络滞”的病机理论为基础,治疗以清热泻火,养阴生津,解毒通络为原则,以苦酸通调为治疗大法。既往临床研究发现^[9],苦酸通调方对肥胖2型糖尿病胰岛素抵抗患者有较好的改善作用。

实验结果表明,与空白对照组相比,糖尿病模型组大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白表达量显著上调,苦酸通调方组在一定程度上能抑制糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 FAS 蛋白的表达,这可能是苦酸通调方抑制脂肪信号通路的传导而发挥其改善胰岛素抵抗治疗糖尿病的机制之一。这为我们以后开展中药复方有效物质的研究提供了思路。

参考文献

[1]陈艳芬,王春怡,李卫民,等. 黄芪葛根汤对糖尿病心肌病大鼠氧化应激和 NF-KB 表达的影响[J]. 中成药,2012,34(8):1428-1432.
 [2]Lanuza-Masdeu J, Arévalo mI, Vila C, et al. In vivo JNK activation in pancreatic β -cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas[J]. Diabetes,2013,62(7):2308-2317.
 [3]Menendez J A, Vazquez Martin A, Ortega F J, Fernandez Real JM. Fatty

acid synthase. Association with insulin resistance, type 2 diabetes and cancer [J]. Clin Chem,2009,55(3):425-38.
 [4]ChoiW J, Jeon B N, Park H, et al. Proto oncogene FBI-1 (Pokemon) and SREBP-1 synergistically activate transcription of fattyacid synthase gene(FASN) [J]. Chin Pharmacol Bull,2006,22(7):780-784.
 [5]Pick A, Clark J, Kubstrup C, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat [J]. Diabetes,1998,47(3):358-64.
 [6]朴春丽,陈曦,于敏,等. 消渴脂平干预自发 II 型糖尿病大鼠炎症及脂代谢的实验研究[J]. 吉林中医药,2011,31(4):379.
 [7]王淑俊,朴春丽,刘禹辛. 苦酸通调 I 号方治疗肥胖型 2 型糖尿病 40 例临床观察[J]. 中华实用中西医杂志,2009,22(4):221-222.
 [8]朴春丽,邓悦,米佳. 苦酸通调法抑制糖尿病脂肪组织炎症机制的理论探讨[J]. 中华实用中西医杂志,2009,22(3):146-148.
 [9]朴春丽,陈曦,米佳. 苦酸通调法治疗糖尿病前期的临床研究[J]. 中外健康文摘,2012,9(44):128.

(上接第 61 页)

参考文献

[1]骆春柳. 青少年睡眠模式、失眠严重问题和白日过度嗜睡与焦虑和抑郁关系的流行病学研究[D]. 广东广州:暨南大学,2011.
 [2]陈勇,赖海标,何希俊,等. 失眠最新研究概况[J]. 陕西中医,2014,34(1):171-172.
 [3]周晓喜. 治疗失眠的药物及其研究进展[J]. 海峡药学,2011,23(03):88-90.
 [4]聂晓伟. 失眠人群的个性特征睡眠质量及中医证候学研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
 [5]李海军,赵世华. 不寐病因病机的中医文献考证[J]. 按摩与康复医学,2011,6(中):187.
 [6]袁玲. 失眠症的辨证分型及辨证施护[J]. 中医临床研究,2011,3(12):94-95.
 [7]任菊红,胡晓灵. 失眠的中医文献研究[J]. 新疆中医药,2015,33(2):76-78.
 [8]杨军雄,张建平,于建春,等. 针灸治疗失眠症的临床疗效研究[J]. 中国全科医学,2013,16(4):466-468.
 [9]张会敏,曹玉新. 不寐的病因病机探讨[J]. 中国中医药,2013,11(22):122-123.
 [10]清·叶桂. 医效秘传[M]. 上海:上海科学技术出版社,1963.
 [11]冯国湘,蒋谷芬. 针灸治疗失眠症 65 例

疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(4):350-351.
 [12]许飞,尹明浩,姚芳,等. 针灸治疗失眠 55 例疗效观察[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(2):324-325.
 [13]谢文霞,曹高忠,叶天申,等. 腹针加体针辨证治疗失眠的临床研究[J]. 针灸临床杂志,2007,23(10):5-6.
 [14]夏筱方. 调任督针刺法治疗阴虚火旺型失眠症临床观察[J]. 上海针灸杂志,2012,31(12):869-870.
 [15]徐艳青. “健脑安神引火归元”针灸法对阴虚火旺型不寐的临床研究[D]. 广西南宁:广西中医药大学,2014.
 [16]朱亚楠. 镇静安神针法治疗阴虚火旺型失眠的临床研究[D]. 吉林长春:长春中医药大学,2012.
 [17]朴雪花. 调补任督法为主针刺治疗阴虚火旺型失眠的临床研究[D]. 吉林长春:长春中医药大学硕士学位论文,2013.
 [18]黄增强. 黄连阿胶汤临床运用[J]. 医护论坛,2009,16(21):161.
 [19]董巧云,李娟娥,姜小帆. 针灸配合黄连阿胶汤治疗围绝经期阴虚火旺型失眠患者疗效观察[J]. 陕西中医,2015,36(8):1068-1069.
 [20]郑舟霞. 针刺结合黄连阿胶汤辅助治疗

更年期失眠临床观察[J]. 新中医,2013,45(8):153-154.
 [21]苗晋玲,王耀华. 针刺配合推拿治疗失眠 38 例[J]. 中国民间疗法,2009,17(10):26-27.
 [22]张奇. 针刺结合头颈部推拿治疗阴虚火旺型失眠症的临床观察[D]. 湖北武汉:湖北中医药大学,2013.
 [23]陈宇清,邵漠. 针刺补泻加耳穴治疗阴虚火旺型失眠的疗效[J]. 广东医学,2013,34(6):966-967.
 [24]侣雪平,吕文静,陈晶晶,等. 针刺配合耳穴贴压治疗阴虚火旺型围绝经期失眠症 38 例临床观察[J]. 中医学报,2013,41(5):120-121.
 [25]涂延玲. 针刺配合梅花针治疗阴虚火旺型失眠疗效观察[D]. 广东广州:广州中医药大学硕士学位论文,2015.
 [26]汪洋. 针刺配合不同波形电针治疗阴虚火旺型失眠症 44 例[J]. 针灸临床杂志,2012,28(12):28-30.
 [27]范郁山,王琼. 针罐结合药线综合治疗阴虚火旺型失眠症 30 例[J]. 陕西中医,2007,28(10):1390-1391.
 [28]石芳. 浅针治疗阴虚火旺型失眠的临床疗效观察[D]. 福建福州:福建中医药大学,2014.