

文章编号:1001-6880(2014)3-0419-04

甘草黄酮对 2 型糖尿病大鼠肝脏中 GSK-3 β 蛋白表达的影响

金 鑫,赵海燕*,马永平

北方民族大学生物科学与工程学院,银川 750021

摘要:本文旨在研究甘草黄酮(LF)对2型糖尿病大鼠肝脏中GSK-3 β 蛋白表达的影响。采用高脂高糖饲料喂养结合一次性小剂量腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法建立2型糖尿病(T2DM)实验大鼠模型。将实验大鼠分为正常对照组(CON)、糖尿病模型组(DM)、甘草黄酮治疗组(LF)和阳性对照组(PC)。分别以溶剂(1,2-丙二醇)、甘草黄酮[300 mg/(kg·d)]或毗格列酮[10 mg/(kg·d)]连续灌胃6周。采用蛋白免疫印迹(Western-blotting)方法检测各组大鼠肝脏中GSK-3 β 的蛋白表达量。研究结果显示,DM组大鼠肝脏组织中GSK-3 β 的蛋白表达量较CON组显著升高($P < 0.01$);其在LF组和PC组的表达量与DM组相比均显著降低($P < 0.05$)。上述结果表明,LF能显著降低2型糖尿病大鼠肝脏中GSK-3 β 的蛋白表达量,这可能是其改善胰岛素抵抗的分子机制之一。

关键词:甘草黄酮;2型糖尿病;胰岛素抵抗;GSK-3 β ;蛋白表达量

中图分类号:R966

文献标识码:A

Effect of Licorice Flavonoids on GSK-3 β Protein Expression in Liver of Type 2 Diabetic Rats

JIN Xin,ZHAO Hai-yan*,MA Yong-ping

School of Biological Science and Engineering,Beifang University of Nationalities,Yinchuan 750021,China

Abstract:This study aimed to investigate the effect of licorice flavonoids (LF) on GSK-3 β protein expression in liver of type 2 diabetic rats. The type 2 diabetic rat model was replicated by high-fat and high-sugar diet combined with low-dose streptozotocin (STZ) injection. The rats were divided into control group (CON),diabetic model group (DM),LF treatment group (LF),and positive control group (PC). Rats in different groups were administered with solvent (1,2-propanediol),licorice flavonoids [300mg/(kg·d)] or pioglitazone [10mg/(kg·d)],respectively. The protein expression level of GSK-3 β in liver was detected by Western blotting. The experimental results showed that the protein expression level of GSK-3 β in DM group was significantly higher than that of the CON group ($P < 0.01$),while its expression level in LF group and PC group significantly reduced ($P < 0.05$) compared with CON group. These results suggested that licorice flavonoids can significantly decrease the protein expression level of GSK-3 β in liver of T2DM rats. This might be one of the molecular mechanisms that LF ameliorated insulin resistance.

Key words:licorice flavonoids;type 2 diabetes mellitus;insulin resistance;GSK-3 β ;protein expression level

糖原合成酶激酶-3(Glycogen synthase kinase-3,GSK-3)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。该激酶的两种异构体GSK-3 α 和GSK-3 β 均在人类的外周胰岛素敏感组织中表达。在静息细胞中,GSK-3是有活性的,可使糖原合成酶(Glycogen synthase,GS)的丝氨酸位点磷酸化,从而抑制GS的活性,减少糖原合

成;而胰岛素可间接抑制GSK-3的活性,使GS去磷酸化,从而激活GS,促进糖原合成。研究表明,GSK-3的活性增强或异常高表达可导致啮齿动物和人类的胰岛素抵抗^[1,2]。在啮齿动物肥胖和2型糖尿病(T2DM)模型中,GSK-3抑制剂通过增加糖原合成、抑制肝脏糖异生而减少葡萄糖输出,从而增强胰岛素敏感性并改善血糖水平^[3]。因此,GSK-3被认为是治疗2型糖尿病新的药物靶点。

已有研究表明,甘草黄酮(LF)可抑制KK-Ay小鼠的血糖升高和腹部脂肪积累;它对高脂饮食诱导

收稿日期:2013-04-01 接受日期:2013-09-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30960510);北方民族大学
2012年研究生创新项目(2012年申报)

*通讯作者 Tel:86-951-2067893;E-mail:hy_zhao06@163.com

的肥胖 C57BL/6J 小鼠的腹部脂肪积累和体重增加有明显的抑制作用,同时可降低血清胰岛素和瘦素的含量;LF 还可显著降低高胆固醇患者的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),并减少 LDL-C 的氧化。本实验室前期研究成果显示,LF 能有效预防大鼠实验性糖尿病的发生,并可降低糖尿病大鼠的血糖、抑制其脂代谢紊乱、改善胰岛素抵抗^[4];本研究采用 Western blotting 方法检测 LF 对 2 型糖尿病大鼠肝脏中 GSK3 β 表达量的影响,旨在探索 LF 改善胰岛素抵抗的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲料

清洁级雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠(40 只)由宁夏医科大学实验动物中心[合格证号:SCXK(宁)2011-0001]提供,体重 180~220 g。饲养于通风良好,相对湿度为 50%~70%,室温 18~22 ℃ 环境中,自由进饮水,12 h 光照周期。普通饲料(标粉 25%,玉米粉 30%,豆粉 10%,麸皮 20%,鱼粉 10%,酵母粉 2%,食盐 1%,鱼肝油 1%,维生素添加剂 0.5%,微量元素添加剂 0.5%)与高脂高糖饲料(普通饲料 61%,猪油 10%,蔗糖 20%,蛋黄粉 8%,胆酸钠 1%)均由北京科澳协力饲料有限公司提供。

1.2 试剂

甘草黄酮系以乙醇为提取剂从甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) 根中提取,并经柱层析进行纯化;盐酸吡格列酮片购自杭州中美华东制药有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司;碘 [¹²⁵I] 胰岛素(INS)放射免疫分析试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司;全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;BCA protein assay kit 购自 Thermo Scientific 公司;兔抗大鼠 GSK-3 β 抗体、GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。其它试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

ONE TOUCH 血糖仪由强生(中国)医疗器材有限公司生产;DU-800 核酸蛋白检测仪由 Beckman 公司生产;Calibrated Densitometer(GS-800)由 Bio-Rad 公司生产。

1.4 动物分组与处理

采用高脂高糖饲料喂养结合一次性小剂量腹腔

注射 STZ 的方法建立 2 型糖尿病(T2DM)实验大鼠模型^[5]。选 30 只实验大鼠以高脂高糖饲料喂养 6 周,空腹 12 h,以 35 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射 1% STZ(溶解于 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液, pH 4.2)。72 h 后尾静脉采血检测大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),稳定在 16.7 mmol/L 以上为造模成功。将成模大鼠(27 只)随机分为糖尿病模型组(DM, 9 只)、甘草黄酮组(LF, 9 只)和阳性对照组(PC, 9 只),继续以高脂高糖饲料喂养,同时每天分别以溶剂(1,2-丙二醇)、甘草黄酮[300 mg/(kg·d)]和吡格列酮[10 mg/(kg·d)]灌胃。每周称一次体重,根据体重变化及时调整给药量[给药量(mg)=体重(kg)×甘草黄酮或吡格列酮给药剂量],持续 6 周(灌胃过程中 LF 组和 PC 组各有 1 只大鼠死亡)。另选同批大鼠 10 只作为正常对照组(CON),以普通饲料喂养,并以溶剂灌胃。

1.5 取样

实验大鼠于处死前空腹 12 h,禁食不禁水,10% 水合氯醛(400 mg/kg)麻醉后迅速将其胸腔打开,心脏取血并分离血清。取部分肝脏用锡箔纸包裹后置于液氮中速冻,-80 ℃ 冰箱保存,备用。

1.6 空腹血糖和胰岛素检测

实验大鼠于处死前空腹 12 h,禁食不禁水,尾静脉采血,检测各组大鼠 FBG。放射免疫法测定空腹血清胰岛素(FINS)含量,具体操作按试剂盒说明进行。根据 FBG 和 FINS 的测定结果,计算 ISI。

$$ISI = \ln(FBG \times FINS)^{-1}$$

1.7 免疫印迹法(Western-blotting)分析

1.7.1 肝脏总蛋白提取与定量

采用全蛋白提取试剂盒提取肝脏总蛋白,BCA protein assay kit 制作蛋白标准曲线,在 562 nm 下用 DU-800 测定各样品吸光值,计算各样品的蛋白含量。

1.7.2 Western-blotting

精确量取相当于 30 μg 蛋白质的样品液,与 2 × 上样缓冲液等体积混合,100 ℃ 变性处理 3~5 min; SDS-PAGE(7.5% 分离胶和 5% 浓缩胶)分离蛋白质。分离的蛋白质电转移至 PVDF 膜。根据预染标准蛋白分子量的位置,将目的蛋白分子量范围的膜切下,以 3% BSA 室温封闭 1.5 h。每条膜分别以封闭液配制的兔抗大鼠 GSK-3 β 抗体或 GAPDH 抗体 4 ℃ 孵育过夜。PBS-Tween-20 洗膜 3 次,每次 10 min。加入封闭液配制的二抗(辣根过氧化物酶标记的),

室温孵育1 h。采用ECL试剂盒显色并用X射线胶片感光。

1.7.3 图像扫描及分析

采用Calibrated Densitometer(Bio-RAD, GS800)对胶片进行扫描,用Quality One软件对目的蛋白条带进行定量。蛋白相对表达量用(靶蛋白/GAPDH/Standard)的OD值表示。注:1) GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)的英文缩写,作为内部参照(Internal Control)。该蛋白是由管家基因编码表达的蛋白(Housekeeping Proteins),其在各组织和细胞中的表达相对恒定,在Western Blotting实验中常用来做参照物,以校正上样过程中存在的实验误差,保证实验结果的准确性;2) Standard为内标,是某只大鼠肝脏的蛋白提取样品,每块胶板上都采用相同的内标,以

校正不同胶板之间的误差。

1.8 数据分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据间比较采用SPSS 19.0软件包处理,进行t检验分析。

2 实验结果

2.1 LF对实验大鼠空腹血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的影响

LF对实验大鼠血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数的影响如表1所示。与CON组相比,DM组大鼠的FBG显著升高($P < 0.01$)、ISI显著下降($P < 0.01$)。与DM组相比,LF组和PC组大鼠的FBG显著降低($P < 0.01$),ISI显著升高($P < 0.01$)。各组FINS无显著差异。

表1 LF对空腹血糖、胰岛素和胰岛素敏感指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of LF on levels of FBS, FINS and ISI ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	例数 n	空腹血糖 FBG (mmol/L)	空腹胰岛素 FINS (mIU/L)	胰岛素敏感指数 ISI
正常对照组 CON	10	4.54 ± 0.55	24.22 ± 5.97	-4.67 ± 0.30
糖尿病模型组 DM	9	22.66 ± 4.25 *	25.26 ± 9.97	-6.22 ± 0.51 *
甘草黄酮组 LF	8	6.17 ± 1.56 △	20.97 ± 8.01	-4.70 ± 0.49 △
阳性对照组 PC	8	6.09 ± 2.35 △	21.61 ± 10.62	-4.66 ± 0.30 △

注: *与CON组相比, $P < 0.01$; △与DM组相比, $P < 0.01$ 。

Note: * compare with CON, $P < 0.01$; △ compare with DM, $P < 0.01$.

2.2 LF对实验大鼠肝脏组织GSK-3 β 蛋白表达量的影响

采用Western-blotting方法对实验大鼠肝脏组织中GSK-3 β 的蛋白表达量进行检测,代表性免疫印迹图如图1所示。与CON组相比,DM组大鼠肝脏组织中GSK-3 β 的蛋白表达量显著升高了86.67%($P < 0.01$)。与DM组相比,LF组和PC组大鼠肝脏组织中GSK-3 β 的蛋白表达量分别降低了44.64%($P < 0.05$)和55.36%($P < 0.05$);LF组与PC组的蛋白表达量没有显著差异。

3 讨论

本研究采用Western Blotting方法,定量分析了甘草黄酮对糖尿病大鼠肝脏组织中GSK-3 β 蛋白表达的影响。研究结果表明,LF可显著降低糖尿病大鼠肝脏组织中GSK-3 β 蛋白的表达量,这是首例关于LF影响胰岛素信号分子蛋白表达的报道。

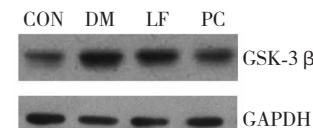


图1 肝脏组织中GSK-3 β 蛋白的免疫印迹图谱

Fig. 1 Immunoblot of GSK-3 β protein in liver

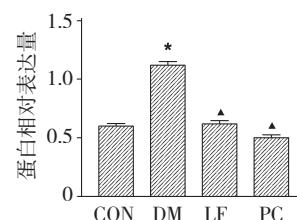


图2 各实验组大鼠肝脏组织中GSK-3 β 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 The expression of GSK-3 β protein in rats' liver of different groups($\bar{x} \pm s$)

注: *与CON组相比, $P < 0.01$; ▲与DM组相比, $P < 0.05$

Note: * compare with CON, $P < 0.01$; ▲ compare with DM, $P < 0.05$

胰岛素对葡萄糖利用的促进作用包括刺激葡萄糖向其靶细胞内的转运和增强糖原合成两个生理过程,这两个过程均是胰岛素信号转导的结果。胰岛素信号转导的任何环节出现障碍,均会导致胰岛素抵抗,进而导致T2DM的发生与发展。GSK-3 β 在胰岛素信号转导中起着负调节作用,其活性增强或异常高表达可导致啮齿动物和人类的胰岛素抵抗^[1,2]。研究表明^[6,7],肌肉中胰岛素调节葡萄糖利用的主要环节是葡萄糖转运;而在肝脏中,葡萄糖转运不是限速步骤。GSK-3抑制剂CHIR98023和CHIR99021可显著提高Zucker糖尿病肥胖(fa/fa)大鼠对葡萄糖的利用,主要是通过增强胰岛素刺激的肝脏组织的糖原合成,而对肌肉组织的葡萄糖转运和糖原合成无影响^[8]。上述结果提示,肝脏中GSK-3的抑制是促进机体对葡萄糖的利用和改善胰岛素抵抗的主要靶点。本研究中LF显著降低了DM组大鼠肝脏组织中GSK-3 β 蛋白的表达量,表明LF可能通过下调GSK-3 β 的表达增强肝脏组织的糖原合成,从而改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗。

许多用于治疗糖尿病的胰岛素增敏剂,如噻唑烷二酮(thiazolidinedione, TZD)类中的troglitazone(曲格列酮)、pioglitazone(匹格列酮)和rosiglitazone(罗格列酮)都是PPAR- γ 的激活剂^[9]。已有研究证实,某些甘草黄酮组分具有PPAR- γ 配体结合活性^[10],提示这些组分可能是TZD药物的结构类似物。本研究采用匹格列酮作为阳性对照,它对GSK-3 β 蛋白表达的下调程度与LF的作用相当,提示LF与匹格列酮对该蛋白表达的调节作用类似。

综上所述,甘草黄酮能显著降低2型糖尿病大鼠肝脏中GSK-3 β 的蛋白表达量,这可能是其改善胰岛素抵抗的分子机制之一。

参考文献

- Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, et al. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*, 1999, 48:1662-1666.
- Nikouline SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, et al. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2000, 49:263-271.
- Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, et al. Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization *in vitro* and *in vivo*. *Diabetes*, 2003, 52:588-595.
- Zhao HY(赵海燕), Wang Y(王勇), Ma YP(马永平), et al. Suppressive effect of licorice flavonoids on hyperglycemia and hyperlipidemia in type 2 diabetic rats. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2010, 20:2573-2578.
- Yang Y(杨雁), Hu SH(胡蜀红), Zhang JH(张建华), et al. Alzheimer-like hyperphosphorylation of Tau in brains of rats with obesity and type 2 diabetes. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2006, 33:456-464.
- Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. ^{31}P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate: evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1992, 89:1069-1075.
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 1999, 341:240-246.
- Cline GW, Johnson K, Regitnig W, et al. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes*, 2002, 51:2903-2910.
- Kaplan F, Al-Majali K, Betteridge DJ. PPARD, insulin resistance and type 2 diabetes. *J Cardiovasc Risk*, 2001, 8:211-217.
- Mae T, Kishida H, Nishiyama T, et al. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-A γ mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*, 2003, 133:3369-3377.