

[文章编号] 1007-3949(2011)19-07-0547-05

• 实验研究 •

MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠脂肪组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶、c-jun 氨基末端激酶蛋白的表达及左归复方的保护作用

吴勇军, 喻嵘, 成细华, 夏金华, 吴慧
(湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 左归复方; 2 型糖尿病; MKR 小鼠; 糖代谢; 炎症因子; p38 丝裂原活化蛋白激酶; c-jun 氨基末端激酶

[摘要] 目的 观察 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠脂肪组织磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶、c-jun 氨基末端激酶蛋白表达的变化及左归复方(滋阴益气活血解毒组方)的保护作用。方法 40 只 MKR 小鼠经鉴定后,随机分为 MKR 模型组、左归复方高、低剂量组、文迪雅组,每组 10 只。C57BL/6J(C57)野生鼠 10 只作为空白对照组。各药物组分别以相应剂量连续给药 30 天。于给药前、第 15 天及第 30 天,分别作空腹血糖测定。末次给药后 0.5 h,心脏取血,放射免疫法测血清胰岛素,酶联免疫吸附测定法检测血清细胞间黏附分子、血管细胞黏附分子,Western blotting 和免疫组织化学检测磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶、c-jun 氨基末端激酶蛋白在脂肪组织中的表达。结果 ①左归复方干预治疗后,其高剂量具有显著的降低 MKR 小鼠空腹血糖、改善高胰岛素血症的作用($P < 0.05$, $P < 0.01$);②MKR 鼠具有显著增高的炎症因子水平,而左归复方干预治疗后具有降低与炎症反应相关的细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 水平的作用($P < 0.01$);③MKR 小鼠脂肪组织中 p38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-jun 氨基末端激酶蛋白表达均上调,但与 C57 野生鼠比较差异无统计学意义($P > 0.05$);左归复方干预治疗后, MKR 小鼠脂肪组织中 p38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-jun 氨基末端激酶蛋白表达均显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),左归复方下调 p38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-jun 氨基末端激酶蛋白表达与阳性对照药文迪雅作用相当。结论 左归复方能显著改善 MKR 小鼠糖代谢及其炎症损伤,其机制为下调脂肪组织中磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-jun 氨基末端激酶蛋白表达,增强脂肪组织对胰岛素的敏感性和炎症抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Research on p38 Mitogen-activated Protein Kinase and c-jun Amino-terminal Kinase Expression in Adipose Tissue of Transgenic Type 2 Diabetic MKR Mice and Protective Action of Zuogui Recipe

WU Yong-Jun, YU Rong, CHENG Xi-Hua, XIA Jin-Hua, and WU Hui

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] Zuogui Recipe; Type 2 Diabetes Mellitus; MKR Mice; Sugar Metabolism; Inflammatory Factor; p38 Mitogen-activated Protein Kinase; c-jun Amino-terminal Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of of Zuogui recipe (ZR) on glucose metabolism and p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) and c-jun amino-terminal kinase (JNK) expression in the adipose tissue of MKR mice.

Methods Forty qualified MKR mice were equally randomized into 4 groups: model group (MG), low-dose ZP group (LZP), high-dose ZP group (HZP) and positive control group (PCG). LZP, HZP and PCG were treated by corresponding drugs for 30 days. Using C57 mice as the controls, the fasting blood glucose (FBG), the serum insulin, and the serum intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) level were determined; the expression of p38MAPK and JNK protein in the adipose tissue were determined by Western blotting and the SABC im-

[收稿日期] 2011-04-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973749);湖南省自然科学基金杰出青年基金(08JJ1005);湖南省中医药科研基金重点项目(2009003);湖南省高校创新平台开放基金(09K059)

[作者简介] 吴勇军, 硕士, 副教授, 从事中药药理与药性研究, 电话为 15802636369, E-mail 为 wuyj@21cn.com。通讯作者喻嵘, 医学博士, 教授, 电话为 0731-88458072, E-mail 为 yuron@hotmail.com。

munohistochemistry. **Results** Hyperglycemia in HZP was significantly ameliorated and fasting blood glucose was decreased after treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with C57 mice, the serum ICAM-1 and VCAM-1 level were significantly increased, and the expression of p38MAPK and JNK protein in the adipose tissue of model group were increased weakly. After treatment, the serum ICAM-1 and VCAM-1 level were significantly decreased, and the expression of p38MAPK and JNK protein in the adipose tissue of HZP and LZP groups were also significantly decreased ($P < 0.01$), compared with the model group. **Conclusion** Zuogui recipe has obvious effect on improving glucose metabolism and inflammatory reaction in MKR mice, and its mechanism may be related to the decrease of p38MAPK and JNK protein expression in adipose tissue, the increase of sensitivity of peripheral tissue to insulin, and the improvement of insulin resistance in the mice.

胰岛素抵抗在2型糖尿病中具有十分重要的作用。近年研究认为胰岛素抵抗是一个低度炎症状态,大量由免疫细胞和脂肪细胞分泌的炎性介质参与了胰岛素抵抗的发生、发展,而且,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、c-jun 氨基末端激酶(c-jun amino-terminal kinase, JNK)通路以及抑制物激酶(IKK)/核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路也参与了此过程。它们相互作用共同促进了胰岛素抵抗发生、发展,并为胰岛素相关性疾病的防治提供又一个新的靶点。本研究在前期工作基础上,以良好的MKR转基因2型糖尿病小鼠为研究对象^[1,2],探讨左归复方(滋阴益气活血解毒组方)的干预作用,以及对实验小鼠脂肪组织中磷酸化p38MAPK和JNK蛋白表达的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

MKR小鼠(采用组织特异性过度表达转基因技术产生),由美国国立卫生研究院(Dr. D. LeRoith)提供MKR小鼠(纯合子),经自然交配后繁殖的子代用于实验观察。C57野生鼠购自中南大学实验动物学部,SPF级,生产许可证号SCXK(湘)2006-0002。

1.2 饲养条件及环境

实验用小鼠饲养在湖南中医药大学SPF级实验动物中心。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按SPF级实验动物的要求进行制备与消毒。

1.3 药物

左归复方(滋阴益气活血解毒组方):由熟地18g、山茱萸12g、黄芪18g、山药12g、菟丝子6g、丹参12g等11味药组成,药材购自湖南中医药大学杏林药号,经鉴定为正品后,经水煎2次,合并煎液,过滤浓缩至含药1kg/L,4℃冰箱贮存备用。文迪雅:葛兰素史克(天津)有限公司,国药准字为

H20020475,批号为08020009。

1.4 试剂与试剂盒

末端全血葡萄糖测试条:北京怡成生物电子技术有限公司,批号为20080810;胰岛素放射免疫试剂盒:北京北免东雅生物技术研究所提供,批号为080420;细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule, ICAM)、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM)试剂盒:由武汉博士德生物工程有限公司提供。Western blotting用试剂:p38MAPK、JNK(Santa Cruz公司),Actin及二抗(Sigma公司),NE-PER[®]细胞核/质蛋白抽提试剂盒(Pierce78833),Halt[™]蛋白酶抑制剂(Pierce78410),SuperSignal[®] West Femto超灵敏化学发光底物(Pierce34095),BCA protein assay kit(Pierce23225),PVDF膜(Millipore公司),SeeBlue Plus蛋白预染Marker(Invitrogen公司),TMED(Sigma公司);通用型SABC试剂盒(博士德公司);p38MAPK、JNK鼠抗人单克隆抗体(博士德公司)。

1.5 主要仪器

怡成超越(JPS-III型)血糖测试仪,北京怡成生物电子技术有限公司提供;高速冷冻离心机(BeckmanAllerga 25R),美国;Ultrospec4300紫外可见分光光度计,瑞士安法玛西亚公司;80℃超低温冰箱,日本SANYO公司;Bio-Rad mini型垂直电泳仪及半干转膜系统,Bio-Tek酶标仪。

1.6 实验方法及指标检测

1.6.1 左归复方对MKR小鼠的干预作用研究

40只经遗传鉴定的MKR小鼠在出生第8周时剪尾采血进行血糖检测^[2]。根据血糖水平、性别分层,随机分为MKR模型组、左归复方高、低剂量组、阳性对照组(文迪雅)。左归复方高、低剂量组分别以生药62.4、15.6g/kg灌胃给药,文迪雅组以0.52g/kg灌胃给药,MKR模型组、C57野生鼠组(10只)以等体积蒸馏水灌胃。灌胃容量为0.02L/kg。每日定时灌胃1次,连续给药30天。于给药前、第15天

及第 30 天,分别作空腹血糖测定。末次给药后 0.5 h,心脏取血,分离血清, -20℃ 冰箱保存备用。同时在冰上迅速取小鼠生殖腺周围脂肪组织,利刃分为两部分,一部分液氮保存,用于 Western blotting 实验;一部分用 4% 多聚甲醛固定后用于石蜡包埋,制备常规石蜡切片,用于免疫组化检测。

1.6.2 Western blotting 方法和图像分析 ①核蛋白提取:将 30 mg 组织块置于 1~2 mL 匀浆器中球状部位,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎;加 400 μ L NE-PER[®]细胞核/质蛋白抽提试剂盒裂解液(含 cocktail)于匀浆器中进行匀浆。然后置于冰上 30 min;4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清分装于 0.5 mL 离心管中并置于 -70℃ 保存;取 5 μ L 测蛋白浓度,按 BCA protein assay kit(Pierce 23225)操作说明进行。②电泳和转膜条件:上样量 100 μ g,积层胶 80 V,分离胶 120 V,转膜 60 min(均在冰盒环境中进行)。③光密度分析:用 Bio-Rad 公司的分析软件进行分析,Actin 蛋白为内参照,以 p38MAPK、JNK 蛋白和 Actin 蛋白的光密度比值表示 p38MAPK、JNK 蛋白表达水平。

1.6.3 免疫组化分析方法、结果判定和图像分析 检测方法:石蜡切片常规脱蜡、梯度水化处理;0.3% 过氧化氢中处理消除内源性过氧化酶;将切片进行组织抗原修复,洗涤,滴加血清封闭液,37℃ 下封闭 5 min;滴加第一抗体,37℃,湿盒中作用 60 min,磷酸盐缓冲液(PBS)液洗涤;滴加第二抗体,37℃,湿盒中作用 30 min,PBS 液洗涤;滴加 SABC,37℃,湿盒中作用 30 min;PBS 液洗涤;DAB 液显色,苏木素复染;脱水、透明、封片。

结果判定和图像分析:以细胞内有明显的棕黄色信号颗粒或信号斑为阳性,不着色为阴性。PBS 取代一抗作阴性对照,已知阳性组织作阳性对照。利用图像分析系统对蛋白表达进行图像分析。先在

显微镜下仔细观察每一片的表达状况,选蛋白表达阳性者进行测量。每次测量前,均以统一的空白片作标准,调整系统光度值,设定标准灰度,在同一灰度条件下,避开无细胞的区域,在同一光强下每片随机选择 5 个不相重叠的表达阳性的视野(20 $\times$),用鼠标按细胞的形态画出细胞轮廓,自动测量,检测阳性细胞的平均灰度值。系统设定白色最大灰度为 256,黑色最小灰度为 0。因此,灰度值越小,代表其阳性反映程度越高。

1.7 统计学处理

多组计量资料数据处理,采用 SPSS 13.0 统计软件单因素方差分析进行处理。

2 结 果

2.1 左归复方对 MKR 小鼠血糖、胰岛素及细胞间黏附分子和血管细胞黏附分子的影响

结果表明,给药 30 天时,左归复方高剂量与文迪雅均有显著的降低空腹血糖的作用(与模型组相比, $P < 0.01$),且两组降低空腹血糖的作用相当。此外,给药 30 天时,左归复方高剂量与文迪雅均有显著降低空腹胰岛素含量的作用(与模型组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明该组方具有降低高胰岛素水平、改善胰岛素抵抗的作用(表 1)。

在改善细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 的方面,MKR 鼠显示出显著增高的 ICAM-1 和 VCAM-1 水平,表明 MKR 鼠具有显著的与炎症反应状态密切相关的炎症因子含量的改变。而左归复方的高、低剂量和文迪雅均有降低血清中 ICAM-1 和 VCAM-1 含量的作用,与模型组相比,差异具有非常显著性意义($P < 0.01$)。表明左归复方具有降低与炎症反应相关的 ICAM-1 和 VCAM-1 水平的作用,从而改善 MKR 鼠的炎症损伤和进一步的血管损伤(表 1)。

表 1. 左归复方对 MKR 小鼠空腹血糖、胰岛素、ICAM-1 和 VCAM-1 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1. The level of fasting plasma glucose, insulin, ICAM-1 and VCAM-1 in MKR mice

分 组	空腹血糖 (mmol/L)	空腹胰岛素 (mU/L)	ICAM-1 (mg/L)	VCAM-1 (mg/L)
C57 野生鼠组	3.35 $\pm$ 0.28 ^b	9.23 $\pm$ 2.54 ^b	0.098 $\pm$ 0.006 ^b	0.208 $\pm$ 0.313 ^b
MKR 模型组	9.57 $\pm$ 1.73	32.58 $\pm$ 6.74	0.983 $\pm$ 0.216	1.187 $\pm$ 0.224
左归低剂量组	8.72 $\pm$ 1.23	29.23 $\pm$ 6.32	0.423 $\pm$ 0.079 ^b	0.806 $\pm$ 0.091 ^b
左归高剂量组	7.07 $\pm$ 0.89 ^b	17.06 $\pm$ 4.72 ^b	0.379 $\pm$ 0.069 ^b	0.730 $\pm$ 0.135 ^b
文迪雅组	8.25 $\pm$ 1.62 ^a	21.33 $\pm$ 5.48 ^a	0.456 $\pm$ 0.070 ^b	0.832 $\pm$ 0.068 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 MKR 模型组比较。

2.2 左归复方对 MKR 小鼠脂肪组织中 p38MAPK、JNK 蛋白表达的影响

Western blotting 结果表明,与 C57 野生鼠组比较,模型组 p38MAPK、JNK 蛋白在脂肪组织的表达均上调,但差异无显著性 ($P>0.05$);与模型组相比较,左归复方高剂量组和文迪雅组小鼠脂肪组织中 p38MAPK、JNK 蛋白表达均显著下调 ($P<0.01$)。与左归复方低剂量组相比较,左归复方高剂量和文迪雅组小鼠脂肪组织中 p38MAPK、JNK 蛋白表达亦显著下调 ($P<0.05$;图 1 和表 2)。

表 2. 左归复方对 MKR 小鼠脂肪组织 p38MAPK 和 JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The expression of p38MAPK and JNK in adipose tissue of the MKR mice treated by Zuogui recipe

分 组	n	p38MAPK/ β -Actin	JNK/ β -Actin
C57 野生鼠组	5	1.17 $\pm$ 0.11	1.13 $\pm$ 0.12
MKR 模型组	5	1.32 $\pm$ 0.14	1.43 $\pm$ 0.14
左归低剂量组	5	1.29 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 0.15
左归高剂量组	5	0.61 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.55 $\pm$ 0.03 ^{ab}
文迪雅组	5	0.55 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.47 $\pm$ 0.06 ^{ab}

a 为 $P<0.01$,与模型组比较;b 为 $P<0.05$,与左归低剂量组比较。

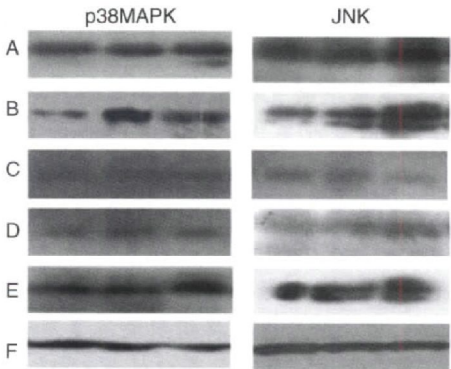


图 1. 各组小鼠脂肪组织 p38MAPK 和 JNK 蛋白印迹图
A 为 MKR 模型组,B 为左归低剂量组,C 为左归高剂量组,D 为文迪雅组,E 为 C57 野生鼠组,F 为 Actin。

Figure 1. Western blot detection of the p38MAPK and JNK in adipose tissue of the MKR mice

免疫组织化学结果显示,磷酸化 p38MAPK、JNK 蛋白表达定位在细胞核,呈棕黄色。在脂肪组织中,C57 野生鼠 p38MAPK 和 JNK 蛋白表达呈阳性,MKR 小鼠 p38MAPK 和 JNK 蛋白表达明显增强。以左归复方高剂量和文迪雅灌胃给药 MKR 小鼠 30 天后,p38MAPK 和 JNK 蛋白表达均下调,呈弱阳性(图 2、图 3)。

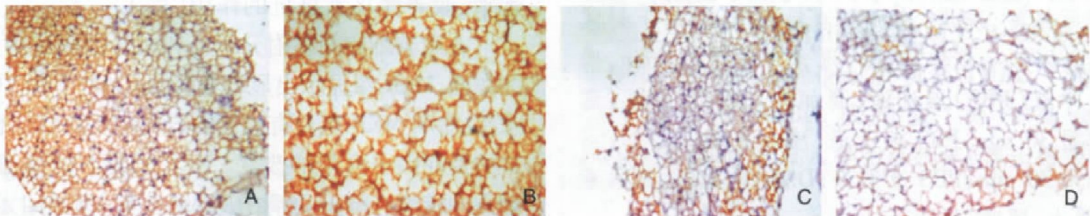


图 2. 脂肪组织中 p38MAPK 蛋白的表达 A 为 C57 野生鼠组,B 为模型组(MKR 小鼠),C 为左归高剂量组,D 为文迪雅阳性组。
Figure 2. Immunohistochemistry detection of the p38MAPK in adipose tissue

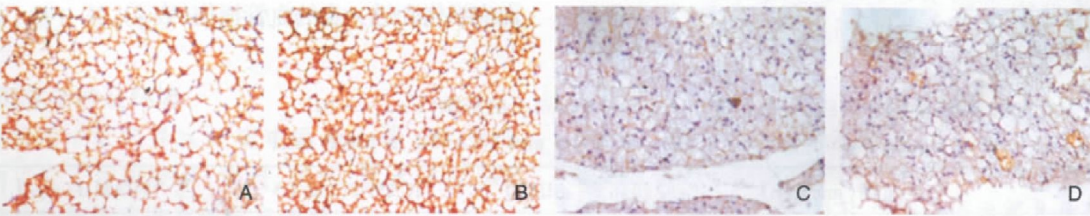


图 3. 脂肪组织中 JNK 蛋白的表达 A 为 C57 野生鼠组,B 为模型组(MKR 小鼠),C 为左归高剂量组,D 为文迪雅阳性组。
Figure 3. Immunohistochemistry detection of the JNK in adipose tissue

3 讨 论

我国糖尿病及其慢性并发症的发病率逐年增高,目前已成为继心脑血管疾病、恶性肿瘤之后第三

大疾病。因而有效防治 2 型糖尿病及其慢性并发症并阐明其作用机制具有重要的意义。

丝裂原活化蛋白激酶在哺乳动物细胞多种信号转导通路中起重要作用,p38 丝裂素活化蛋白激酶

作为其成员之一,通过炎症因子、游离脂肪酸、氧化应激等对脂肪、骨骼肌作用,在 2 型糖尿病胰岛素分泌和胰岛素抵抗发病机制中有重要的作用。JNK 作为丝裂原激活蛋白激酶家族成员,能使某些蛋白结构中丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,使其活化或改变其原有活性而产生异常效应。目前认为,JNK 参与肥胖、胰岛素抵抗和炎症等代谢过程,JNK 还参与了多种病理过程,如心脏肥大反应,糖尿病相关高血糖引起的内皮细胞凋亡和糖尿病相关的胰腺 β 细胞凋亡,神经萎缩等疾病。阻断 JNK 通路可改善胰岛 β 细胞功能和胰岛素抵抗,诱导活化 JNK 通路可导致 2 型糖尿病的发生发展^[3-6]。

本研究中,与野生型 C57 小鼠比较, MKR 鼠的空腹血糖、空腹胰岛素含量以及细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 显著升高;同时,脂肪组织中磷酸化 p38MAPK 和 JNK 蛋白的表达均有上调趋势。左归复方由熟地、山茱萸、黄芪、山药、丹参等 11 味中药组成,熟地味甘微温质润,既补血滋阴,又能补精益髓;山茱萸有补益肝肾、涩精固脱的作用,现代研究表明其还有抗应激、抗氧化、降血脂的功效;黄芪性微温,味甘,有补气固表、利尿、退肿之功效,用于治疗气虚乏力、慢性肾炎、蛋白尿、糖尿病等。因而全方具有滋阴益气、活血解毒的功效,对 2 型糖尿病及其心、肾合并症具有防治作用^[7-9]。本研究显示,左归复方具有显著地降低 MKR 小鼠空腹血糖、改善高胰岛素血症、降低血清中炎症因子水平的作用。同时,经左归复方治疗后, MKR 鼠脂肪组织中磷酸化 p38MAPK 和 JNK 蛋白的表达均显著下调。上述研究表明,左归复方可能是通过调控炎症因子的表达,增强胰岛素靶器官对胰岛素的敏感性,减轻胰岛素抵抗,而改善 2 型糖尿病并延缓其血管并发症的发生发展。

致谢

美国 National Institutes of Health 的 Derek LeRoith 博士提供 MKR 小鼠,特此致谢。

参考文献

- [1] Fernandez AM, Kim JK, Yakar S, et al. Functional inactivation of the IGF-1 and insulin receptor in skeletal muscle causes type 2 diabetes [J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (15): 1 926-934.
- [2] 喻嵘,成细华,胡伟,等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子 1 与胰岛素双受体功能缺失所致小鼠 2 型糖尿病 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16 (7): 438-440.
- [3] 贺钰梅,肖常青,庞翠军. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路对胰岛素作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2010, 16 (19): 2 902-904.
- [4] 刁雪红,申鏖,张跃力,等. 抑制 Rac1 通过降低磷酸化 p38MAPK 提高 1 型糖尿病小鼠的心脏功能 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26 (7): 854-856.
- [5] 王慧敏,都健. JNK 信号转导通路与 2 型糖尿病 [J]. *国际内科学杂志*, 2009, 36 (3): 128-130.
- [6] 刘光宇,安振梅. 罗格列酮钠保护 STZ 糖尿病大鼠胰岛 β -细胞及对 JNK 信号通路的影响研究 [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2009, 38 (3): 386-389.
- [7] 成细华,喻嵘,吴勇军,等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢和抗氧化应激的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39 (11): 1 675-678.
- [8] 吴勇军,喻嵘,成细华,等. 左归降糖益肾方对高脂饮食 MKR 鼠糖脂代谢和炎症反应的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (12): 105-108.
- [9] 成细华,喻嵘,伍参荣,等. 左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2011, 42 (1): 1-4.

(此文编辑 曾学清)