

明日叶查尔酮对2型糖尿病大鼠肝脏和骨骼肌葡萄糖转运体表达的影响

赵阳 刘贝 李蕾¹ 钟进义²

青岛大学医学院公共卫生系, 青岛 266021

摘要:目的 研究明日叶查尔酮对2型糖尿病大鼠肝脏葡萄糖转运体2(Glut2)和骨骼肌葡萄糖转运体4(Glut4)蛋白表达的影响。方法 制造2型糖尿病大鼠模型,随机分成高、中、低剂量组和糖尿病对照组,分别每日灌胃给予30、10、5和0mg/kg BW明日叶查尔酮。各组以高脂饲料喂养4周后,用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖;放射免疫法检测血清胰岛素含量;免疫组化法检测葡萄糖转运体蛋白表达水平。结果 经图像分析,高剂量组肝脏和骨骼肌葡萄糖转运体蛋白表达平均光密度值分别为(0.036±0.0030)和(0.063±0.0139),均较糖尿病对照组显著升高($P < 0.05$)。高剂量组空腹血糖和胰岛素水平分别为(12.3±1.64)mmol/L和(25.65±3.34) μ IU/ml,均较糖尿病对照组显著性降低($P < 0.05$)。结论 明日叶查尔酮可上调2型糖尿病大鼠肝脏葡萄糖转运体2和骨骼肌葡萄糖转运体4蛋白表达水平,降低空腹血糖和胰岛素水平,改善糖尿病胰岛素抵抗状况。

关键词: 明日叶查尔酮 2型糖尿病 葡萄糖转运体

中图分类号: R587.1 R282.71 Q593

文献标识码: A

Effects of angelica keiskei chalcone on expression of glucose transporter proteins in liver and skeletal muscle cells of type 2 diabetic rats

ZHAO Yang, LIU Bei, LI Lei, ZHONG Jinyi

Department of Public Health, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China

Abstract: Objective To investigate the effect of angelica keiskei chalcone (AC) on the expression of glucose transporter 2 (Glut2) in liver and glucose transporter 4 (Glut4) in skeletal muscle cells of rats with type 2 diabetes. **Methods** Made type 2 diabetic rat models and divided into high, middle, low dose groups and diabetic control group randomly which were given chalcone 30, 10, 5 and 0mg/kg BW respectively. Four groups were fed with the diet containing high fat. After four weeks, fasting blood glucose was determined by glucose oxidase method. Insulin was assessed by radio-immunity method. The expression levels of Glut2 in liver and Glut4 in skeletal muscle cells were analyzed by immunohistochemistry method. **Results** After analyzed by Image-Pro Plus on immunohistochemistry pictures, the expression levels of Glut2 in liver and Glut4 in skeletal muscle cells in high group were (0.036±0.0030) and (0.063±0.0139),

基金项目: 山东省卫生厅青年基金(No. QNW001)

作者简介: 赵阳,女,硕士研究生,研究方向: 食品毒理, E-mail: zhaoyang5256@126.com

¹ 厦门大学公共卫生学院

² 通讯作者: 钟进义,男,教授,博士生导师, E-mail: zhongjy03@yahoo.com.cn

which were significantly higher than the model control group ($P < 0.05$). The levels of fasting blood glucose and insulin in high dose group were (12.3 ± 1.64) mmol/L and (25.65 ± 3.34) μ IU/ml, significantly lower than those of the model control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Angelica keiskei chalcone may increase the expression levels of Glut2 in liver and Glut4 in skeletal muscle cells, decrease fasting blood glucose and insulin of type 2 diabetic rats and improve their insulin resistance condition.

Key words: angelica keiskei chalcone, type 2 diabetes mellitus, glucose transporter

明日叶(Angelica keiskei)又名碱草,原产于日本八丈诸岛,属伞形科多年生草本植物^[1]。查尔酮(chalcone)是一种含有1,3-二苯基丙烯酮结构的黄酮类化合物^[2],是明日叶的主要活性成分,在明日叶的根、茎中含量较为丰富。有研究表明,明日叶查尔酮(Angelica keiskei chalcone, AC)具有抗糖尿病、抗氧化、抗肿瘤等多种生物学功效^[3-4]。本实验采用给2型糖尿病大鼠模型口服AC的方法,观察了其对2型糖尿病大鼠肝脏和骨骼肌葡萄糖转运体蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物和饲料 清洁级健康雄性Wistar大鼠,许可证号:scxk(鲁)20090007,体重(170 ± 10)g,由山东鲁抗医药实验中心提供。实验动物于本实验室适应性喂养一周进行实验。高脂饲料和普通饲料购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.1.2 明日叶查尔酮实验样品 由青岛某公司提供,采用有机溶剂浸提法提取,经紫外分光光度法测定,含量大于90%,查尔酮标准品由美国Sigma公司提供。

1.1.3 试剂和仪器 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)购自sigma公司(批号:S0130);胰岛素放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所(批号:20111220),葡萄糖转运蛋白免疫组化试剂盒及兔抗鼠多克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司(批号:lot999805w; lot909091w; 862150A invitrogen);血糖仪及试纸、显微镜、照相机均为OLYMPUS公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 2型糖尿病大鼠模型制备 将实验动物用高脂饲料喂养,4周后腹腔注射STZ。检测空腹血糖,血糖值 >16.7 mol/L者为造模成功。

1.2.2 动物分组与处理 将造模成功的糖尿病大鼠参照血糖随机分成高、中、低查尔酮剂量组和糖尿病对照组,每组10只,均喂饲高脂饲料,分别

每天经口灌胃给予明日叶查尔酮的剂量为30、10、5、0mg/kg BW,正常对照组为正常大鼠喂饲普通饲料,连续饲喂4周。空腹12h,以10%水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血并分离血清,取肝脏和股四头肌标本,检测各项指标。

1.3 检测指标

1.3.1 肝脏 Glut2 和骨骼肌 Glut4 蛋白表达 采用免疫组化法测定。分别取肝脏和股四头肌标本,经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,烤片,脱蜡,脱水,阻断灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,封闭,滴加一抗(肝脏标本 Glut2 兔抗鼠多克隆抗体,骨骼肌标本 Glut4 兔抗鼠多克隆抗体)和二抗,DAB反应染色,苏木素复染,脱水,透明,干燥,封片,高倍显微镜下随机选取视野观察 Glut2 和 Glut4 蛋白表达水平,并采用 Image-ProPlus 图像软件进行光密度分析,每只动物分析2个视野,各组的表达水平以平均光密度值表示。

1.3.2 血清胰岛素含量 采用放射免疫法测定。取血清0.1ml,加入抗体、37℃温育、加分离剂、室温静置、离心等处理后测定沉淀管的放射性计数。测定并依据放射性计数绘制 log-logit 标准曲线,计算出血清胰岛素含量。

1.3.3 血糖 采用葡萄糖氧化酶法测定。尾尖取血滴于血糖仪配套试纸上,读取血糖仪上显示的数据。

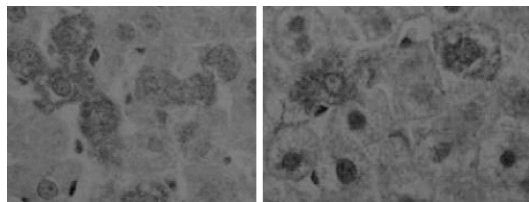
1.4 统计处理

采用 SPSS 18.0 软件对计量资料进行单因素方差分析后,采用 Bonferroni 法,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准进行显著性检验。

2 结果

2.1 Glut2 蛋白表达水平

Glut2 蛋白主要表达于细胞质,呈棕黄色颗粒。本试验肝脏 Glut2 蛋白呈现高剂量组阳性细胞数目多,染色深,为高度表达(图1)。高剂量组与糖尿病对照组平均光密度值分别为(0.036 ± 0.0030)和(0.014 ± 0.0048),差异有显著性($P < 0.05$)。各组 Glut2 蛋白表达平均光密度(MOD)值见表1。



A: 高剂量组Glut2蛋白表达 B: 糖尿病对照组Glut2蛋白表达

图 1 肝组织细胞中 Glut2 蛋白的表达 (DAB × 400)
Figure 1 The expression of Glut2 protein in liver cells(DAB × 400)

表 1 各组大鼠肝脏 Glut2 和骨骼肌 Glut4 蛋白表达水平 (MOD 值)

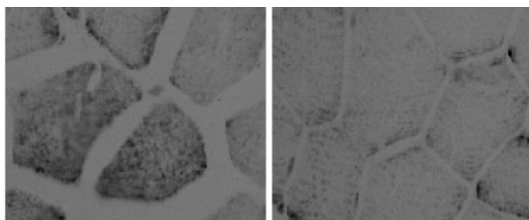
Table1 The expression of Glut2 and Glut4 proteins in liver and skeletal muscle cells in each group(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	Glut2	Glut4
正常对照组	0.042 ± 0.0046	0.075 ± 0.0120
糖尿病对照组	0.014 ± 0.0048 ⁽¹⁾	0.018 ± 0.0087 ⁽¹⁾
低剂量组	0.015 ± 0.0047 ⁽²⁾	0.022 ± 0.0114 ⁽²⁾
中剂量组	0.028 ± 0.0048	0.036 ± 0.0140
高剂量组	0.036 ± 0.0030 ^(2,3)	0.063 ± 0.0139 ^(2,3)

注: (1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; (2) 与中剂量组比较, $P < 0.05$; (3) 与糖尿病对照组比较, $P < 0.05$; $F_{Glut2} = 76.558$, $F_{Glut4} = 42.702$

2.2 Glut4 蛋白表达水平

Glut4 蛋白主要表达于细胞质,呈棕黄色颗粒。本试验骨骼肌 Glut4 蛋白呈现高剂量组阳性细胞数目多,染色深,为高度表达(图 2)。高剂量组与糖尿病对照组平均光密度值分别为(0.063 ± 0.0139)和(0.018 ± 0.0087),差异有显著性($P < 0.05$)。各组 Glut4 蛋白表达平均光密度(MOD)值见表 1。



A: 高剂量组Glut4蛋白表达 B: 糖尿病对照组Glut2蛋白表达

图 2 骨骼肌组织细胞中 Glut4 蛋白的表达 (DAB × 400)
Figure 2 The expression of Glut4 protein in skeletal muscle cells(DAB × 400)

2.3 空腹血糖与空腹胰岛素含量

与糖尿病对照组比较,高剂量组空腹血糖和空腹胰岛素水平均降低,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组测量结果见表 2。

3 讨论

有文献报道明日叶查尔酮具有降低糖尿病氧

表 2 各组大鼠空腹血糖、胰岛素检测结果

Table 2 The fasting blood glucose and fasting insulin in each group(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (μIU/ml)
正常对照组	5.1 ± 0.96	15.03 ± 3.43
糖尿病对照组	18.2 ± 1.51 ⁽¹⁾	48.15 ± 2.83 ⁽¹⁾
低剂量组	18.1 ± 1.96 ⁽²⁾	47.02 ± 3.16 ⁽²⁾
中剂量组	17.8 ± 1.73	45.95 ± 3.83
高剂量组	12.3 ± 1.64 ^(2,3)	25.65 ± 3.34 ^(2,3)

注: (1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; (2) 与中剂量组比较, $P < 0.05$; (3) 与糖尿病对照组比较, $P < 0.05$; $F_{血糖} = 127.227$, $F_{胰岛素} = 205.713$

化应激和血糖水平、改善胰岛素抵抗等作用^[5-6],也有学者研究发现,明日叶查尔酮可通过活化过氧化物酶体有活性的增殖子感受器-c 表现出胰岛素样活性^[7]。本次试验结果可见,糖尿病对照组的空腹血糖和胰岛素水平高于正常对照组,高剂量组的空腹血糖和胰岛素水平则低于糖尿病对照组,表明明日叶查尔酮可降低 2 型糖尿病大鼠血糖和胰岛素水平,改善胰岛素抵抗。

糖尿病的重要表现为胰岛素抵抗,此时骨骼肌、肝脏和脂肪组织等外周组织对胰岛素敏感性降低,葡萄糖的摄取、利用减少。在这些外周组织细胞中转运葡萄糖的是葡萄糖转运体。葡萄糖转运体(Gluts)是一个蛋白家族,目前已经鉴定了 14 种亚型,每种在组织细胞中的表达及其动力学性质均不同^[8]。肝脏最主要的葡萄糖转运体是 Glut2,在肝细胞中 Glut2 与胰岛素受体(IR)形成复合物而发挥作用^[9]。当 Glut2 表达和功能受影响时,可发生肝脏对葡萄糖摄取和利用不足,胰岛素介导的糖代谢异常。本次实验结果表明,糖尿病对照组肝脏 Glut2 蛋白表达水平均较正常对照组显著性降低,而高剂量组则均较糖尿病对照组显著性升高,且呈现其作用随剂量增加而增大的剂量效应关系,说明明日叶查尔酮可增加 2 型糖尿病大鼠肝脏 Glut2 蛋白的表达,进而增强葡萄糖由血液到肝细胞内的转运和肝糖原合成,使血糖浓度降低。

Glut4 主要分布于骨骼肌细胞内,在餐后和运动时,Glut4 转运葡萄糖的速率大幅提高^[10]。Glut4 为胰岛素敏感的葡萄糖载体。胰岛素与细胞外膜上的胰岛素受体结合,经过一系列信号使细胞内含有 Glut4 的囊泡移动到细胞膜并与之融合,使膜表面 Glut4 含量猛增,大幅提高葡萄糖的

(下转第 113 页)

参考文献

- 1 KING W D ,HO V ,DODDS L ,et al. Relationships among biomarkers of one-carbon metabolism [J]. *Mol Biol Rep* , 2012(39) :7805-7812.
- 2 GONG Z J ,YAN S N ,ZHANG P ,et al. Effects of S-adenosylmethionine on liver methionine metabolism and steatosis with ethanol-induced liver injury in rats [J]. *Hepatol Intern* 2008(2) :346-352.
- 3 申丽 ,李东阳 ,姜涌明,等. S-腺苷甲硫氨酸的稳定性及其稳定性盐 [J]. *药物生物技术* ,2003 ,10(2) :125-128.
- 4 陶敏 ,干信. S-腺苷甲硫氨酸的研究现状及应用前景 [J]. *氨基酸和生物资源* 2005 2(3) :49-51.
- 5 FUSO A ,NICOLIA V ,CAVALLARO R A. et al. DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models [J]. *Nutr Biochem* 2011(22) :242-251.
- 6 OBEID R ,SCHADT A ,DILLMANN U ,et al. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease [J]. *Clin Chem* 2009 55(10) :1852-1860.
- 7 徐晓堃 ,周卫华 ,肖传实,等. 系统性红斑狼疮患者基因组 DNA 甲基化水平的初步研究 [J]. *中华风湿病学杂志* 2005 9(2) :94-96.
- 8 GREENBERG A K ,RIMAL B ,FELNER K ,et al. S-adenosylmethionine as a biomarker for the early detection of lung cancer [J]. *Chest* 2007 132(4) :1247-1252.
- 9 POIRIER L A ,WISE C K ,DELONGCHAMP R R ,et al. Blood determinations of S-adenosylmethionine , S-adenosylhomocysteine and homocysteine: correlations with diet [J]. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* ,2001 (10) :649-655.
- 10 STABLER S P ,ALLEN R H. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Clin Chem* 2004 50(2) :365-372.

收稿日期:2012-07-27

(上接第 109 页)

转运,维持血糖稳态^[11]。本次实验结果显示,高剂量组骨骼肌 Glut4 蛋白表达水平较糖尿病对照组显著性升高,表明明日叶查尔酮可提高 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 Glut4 蛋白的表达。

综合本次实验结果可以认为,明日叶查尔酮可降低 2 型糖尿病大鼠血糖和血清胰岛素水平,改善胰岛素抵抗,其调节机制可能与明日叶查尔酮可上调肝脏 Glut2 和骨骼肌 Glut4 表达水平,从而增强了血液中葡萄糖向肝脏和骨骼肌细胞内转运有关。

参考文献

- 1 李佳 ,张智俊 ,周长芳,等. 明日叶的组织培养与快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯* 2006 42(6) :1142.
- 2 郑洪伟 ,牛新文 ,朱君,等. 查尔酮类化合物生物活性研究进展 [J]. *中国新药杂志* ,2007 ,16(18) :1445-1449.
- 3 孟扬 ,钟进义 ,孙赫. 明日叶查尔酮对小鼠肝癌细胞 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达的影响 [J]. *癌变·畸变·突变* 2011 23(1) :50-53.
- 4 HIROSHI O ,YUKIKO O ,TOSHINORI K ,et al. Beneficial effect of xanthoangelol ,a chalcone compound from angelica keiskei ,on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007 34:238-243.
- 5 KYUICHI K ,KEISUKE S ,ITSUKO F ,et al. Prenylated chalcone 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation [J]. *Nutr Food Res* 2011 55:467-475.
- 6 ISA N M ,ABDELWAHAB S I ,MOHAN S ,et al. In vitro anti-inflammatory ,cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A ,a chalcone isolated from Boesenbergia rotunda (L.) (fingerroot) [J]. *Braz J Med Biol Res* , 2012 45:524-530.
- 7 TATSUJI E ,HIROMU O ,KINUKO N ,et al. Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese Herb , Angelica keiskei [J]. *Agric Food Chem* ,2007 (55) :6013-6017.
- 8 赵珂 ,罗勇. 心肌葡萄糖转运体与心脏疾病 [J]. *国际心血管病杂志* 2011 38(4) :220-223.
- 9 陈宽林 ,方明明 ,赵同英. 甲状腺素对鼠肝细胞 PPAR γ 和 GLUT2 表达影响及意义 [J]. *实用临床医药杂志* 2006 10(6) :35-37.
- 10 汪雪峰. GLUT4 研究进展 [J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册* 2003 23(6) :602-604.
- 11 高璐. GLUT4 与胰岛素抵抗 [J]. *国外医学内分泌学分册* 2009 22(5) :308-310.

收稿日期:2012-05-15