论文

中国知名大学及研究院所专栏 北京中医药大学专辑

基于能量限制效应考察中药复方糖耐康干预 *db/db* 小鼠胰岛素抵抗作用机制

李林忆^{①②}, 吴欣莉^①, 秦灵灵^①, 王海焱^①, 姜月滢^①, 孙文^①, 吴丽丽^①, 吕翠岩^③, 许光远^①, 邓莉^①, 徐瞰海^①, 魏颖^①, 刘铜华^{①*}

① 北京中医药大学, 中医药防治糖尿病北京市国际科技合作基地, 教育部中医养生学重点实验室, 北京市中医养生学重点实验室, 北京 100029;

② 首都医科大学附属北京安贞医院, 北京市心肺血管疾病研究所, 上气道功能障碍相关心血管疾病研究北京市重点实验室, 北京 100029;

③ 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010

* 联系人, E-mail: thliu@vip.163.com

收稿日期: 2016-02-17; 接受日期: 2016-05-10

教育部科学研究重大项目(批准号: 311011)和科技部国际科技合作项目(批准号: 2010DFB33260)资助

摘要 胰岛素抵抗(IR)是导致2型糖尿病和多种代谢性疾病发生发展的共同病理生理基础, 通过模拟能量限制调控能量代谢网络已经成为防治 IR 相关疾病的研究热点. 本课题组前期研究结果提示, 中药复方糖耐康可能通过激活 SIRT1-AMPK 通路模拟能量限制效应改善 IR. 通过比较糖耐康和能量限制对自发性 2 型糖尿病 *db/db* 小鼠(*Mus musculus*)糖脂代谢、胰岛功能、线粒体功能和胰岛素敏感性的影响, 进一步验证糖耐康是否可在整体和分子水平模拟能量限制效应进而干预 IR. 与对照组相比, 糖耐康和能量限制均可相似地显著改善 *db/db* 小鼠口服葡萄糖耐量(OGTT)、降低空腹血糖胰岛素(FINS), 升高胰岛素敏感指数(ISI). 同时糖耐康和能量限制还可相似地升高糖负荷后 30 min 胰岛素分泌与血糖变化比值($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$), 降低肌肉 TG 含量, 上调肌肉组织 AMPK 磷酸化水平以及 SIRT1 和 PGC1 α 的蛋白表达水平, 不同程度提高肌肉组织线粒体质量和数量. 以上结果表明, 糖耐康可显著改善 *db/db* 小鼠的糖代谢、胰岛功能、脂质异位沉积、线粒体功能和 IR, 激活肌组织 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路, 上调肌肉脂肪酸氧化相关基因表达, 在整体效应和能量代谢转录调控方面具有能量限制拟似效应, 进而从新的视角揭示了糖耐康干预 IR 的药效模式和分子机制.

关键词 糖耐康, 能量限制, 胰岛素抵抗, 线粒体功能

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是糖尿病、代谢综合征和大血管病变的共同病理基础. 能量过剩

引发慢性炎症和线粒体功能障碍是导致 IR 的主要原因之一^[1]. 与之相对应的生活方式干预, 如能量限制

引用格式: 李林忆, 吴欣莉, 秦灵灵, 等. 基于能量限制效应考察中药复方糖耐康干预 *db/db* 小鼠胰岛素抵抗作用机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 949–958
Li L Y, Wu X L, Qin L L, et al. Tang-Nai-Kang mimics calorie restriction effects and alleviates insulin resistance in diabetic *db/db* mice. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 949–958, doi: 10.1360/N052016-00022

可提高代谢效能, 缓解糖脂毒性和代谢性炎症对机体能量平衡的影响, 进而逆转 IR 的多种病理表现, 是预防和控制 IR 的重要措施, 也是目前公认的促进健康, 延缓衰老最为有效的手段^[2]. 因此, 在代谢病研究领域, 通过药物干预模拟能量限制效应, 改善供能组织和器官的能量代谢和线粒体功能逐渐成为药物研发攻关的焦点^[3].

能量限制(calorie restriction)是指在保证机体基本营养需求基础上, 降低约 30%~40%的能量摄入^[2]. 在能量限制状态下, 机体分解代谢增加, 能量来源主要为脂肪组织动员的脂肪酸, 细胞中氧化态对还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+/NADH)的比值升高, NAD^+ 依赖的去乙酰化酶 1(sirtuin 1, SIRT1)感知这一变化进而激活, 通过去除多种转录因子和共调节子的乙酰基团调控下游基因表达, 将主要能量底物由葡萄糖转换为脂肪酸, 促进线粒体生物合成, 增加脂肪酸氧化速率和线粒体代谢效能, 满足机体能量需求^[4,5]. 与此同时, 禁食或能量限制状态下, 细胞内磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)浓度上升, 腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)浓度下降, AMP/ATP 的比值升高, AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路激活. 活化的 AMPK 可通过增加线粒体氧化磷酸化, 促进线粒体底物分解代谢, 将释放的能量供给 ATP 进行储存, 维持机体能量平衡^[6]. 同时, AMPK 也可调节与脂肪酸氧化和线粒体功能相关转录因子活性, 提高脂肪酸氧化速率和线粒体效能^[7-9].

在多种转基因动物模型上, SIRT1 和 AMPK 之间表现出复杂的相互调控关系, 两者组成了精密协调的代谢调节网络, 协同对抗代谢性疾病的发生发展^[10,11]. 如天然能量限制拟似物(calorie restriction mimetics)白藜芦醇和定向合成的 SIRT1 激动剂的代谢益处主要是通过共同激活 SIRT1 和 AMPK 信号通路实现的^[12]. 因此, SIRT1 和 AMPK 组成的代谢调控网络是调节机体能量代谢基因转录的关键环节, 也是治疗胰岛素抵抗和代谢性疾病药物研发具有吸引力的潜在靶点. 通过靶向 SIRT1-AMPK 通路研发新型药物, 模拟能量限制效应, 整体调控机体能量代谢相关基因的转录表达, 可能为以能量代谢失衡为特征的胰岛素抵抗相关疾病, 如 2 型糖尿病和代谢综合征的预防和治疗带来新的希望.

中药复方糖耐康为中医理论指导下的治疗 IR 的临床经验方, 由夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)、三白草(*Saururus chinensis*)、番石榴叶(*Folium Psidii Guajavae Psidium guajava* L.)、女贞子(*Fructus Ligustri Lucidi*)和人参(*Panax quinquefolius* L.) 5 种中药提取物组成. 具有清热生津、益气养阴的功效. 目前已经完成 III 期临床试验. 通过对 480 例糖尿病前期患者干预, 经与安慰剂对照, 糖耐康对糖耐量低减和空腹血糖受损疗效确切, 无明显毒副作用^[13]. 本课题组前期工作发现, 糖耐康可激活代谢综合征 SHR.Cg-Lepr^{cp}/NDmcr(SHR-cp)大鼠(*Rattus norvegicus*)肌肉和脂肪组织 AMPK-SIRT1 信号通路, 上调脂肪酸氧化相关基因表达, 改善 SHR-cp 大鼠的肥胖、糖脂代谢和 IR 状态, 同时, 本课题组发现糖耐康对 SHR-cp 大鼠能量代谢的转录调控模式与能量限制相类似, 可上调氧化型肌肉纤维标志基因的表达, 抑制糖酵解基因表达, 将能量底物从葡萄糖转变为脂肪酸^[14], 提示糖耐康可能通过促进脂肪酸氧化, 模拟能量限制效应改善 IR. 据此, 本研究选用自发性 2 型糖尿病 BKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/J(*db/db*)小鼠(*Mus musculus*)模型, 进一步验证糖耐康是否可在整体和分子水平模拟能量限制效应从而干预 IR, 为糖耐康治疗胰岛素抵抗相关疾病的临床应用提供实验与理论依据.

1 材料与方法

1.1 动物及分组

BKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/J(*db/db*)小鼠和 *Dock7*^{m+/+}Lepr^{db}(*db/m*⁺)小鼠, 雄性, 3~5 周龄, 购自南京大学模式动物研究所. 饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房, 室温(24±2)℃左右, 空气湿度 40%左右. 动物以正常维持饲料喂养, 自由饮水. 待动物预适应 3 天, 根据空腹血糖(fasting serum glucose, FBG)、体重、空腹血清甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)分为 3 组, 每组 10 只(表 1). 分别为: 模型对照组(CON): 每日灌胃超纯水一次, 每 100 g 体重给 0.5 mL; 能量限制组: 每天 18:00 投喂 CON 组当日摄食量 70%的正常饲料; 糖耐康组(3.24 g/kg): 每日灌胃给药一次, 每 100 g 体重给 0.5 mL. 糖耐康以超纯水配制, 超声助溶 30 min, 现配现用. 另以 10 只同月龄 *db/m*⁺小鼠为正常对照组(Nor). 连续干预 8 周.

表 1 *db/db* 小鼠初筛分组^{a)}

组别	剂量 (g/kg)	空腹血糖 (mg/dL)	体重 (g)	甘油三酯 (mg/dL)	总胆固醇 (mg/dL)
正常组	—	78.2±7.3***	22.1±3.1***	69.5±10.8	75.6±10.5
对照组	—	168.2±63.9	29.5±2.3	80.7±5.2	73.7±5.7
能量限制组	—	166.5±61.4	30.3±2.3	77.4±7.3	74.2±10.7
糖耐康组	3.24	168.3±65.0	29.1±2.3	79.2±5.4	72.6±13.7

a) *db/db* 小鼠以空腹血糖、体重、甘油三酯和总胆固醇 4 因素随机分为 4 组, 每组 10 只: 正常组; 对照组; 能量限制组, 每天 18:00 投喂 CON 组当日摄食量 70% 的正常饲料; 糖耐康组, 每天灌胃给予糖耐康 3.24 g/kg. ***: $P < 0.001$ vs. 对照组

1.2 药物

复方中药糖耐康颗粒剂, 由四川美大康佳乐药业有限公司提供. 制法: 取夏枯草 1000 g, 番石榴叶 1000 g, 女贞子 500 g, 三白草 500 g, 人参 250 g. 以上五味, 人参粉碎成细粉, 备用; 女贞子粉碎, 与余下的夏枯草、三白草及番石榴叶等三味药材, 用 75% 乙醇 8 倍量提取 2 次, 滤过, 合并 2 次滤液, 回收乙醇至相对密度 1.10~1.15(60℃~70℃) 的清膏, 备用; 药渣加水煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至相对密度 1.10~1.15(60℃~70℃) 的清膏, 与乙醇提取清膏及人参细粉混合, 减压干燥, 粉碎成细粉, 加入糊精等辅料适量, 混匀, 制成颗粒, 干燥, 制成 1000 g, 即得^[15]. 所用药材来源于沈阳医药集团公司大东公司, 经参照 2000 年版中国药典一部各品种项下检查, 均符合规定. 糖耐康乙醇提取物中总黄酮和三萜皂苷含量分别为 4.23% 和 3.67%, 水提物中含总多糖 5.83%. 经高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定, 糖耐康中人参皂苷 Rg1, Re, Rb1 和迷迭香酸的含量分别为 0.09%, 0.12%, 0.10% 和 0.55%^[14].

1.3 检测指标及方法

(1) 血液及生化指标测定. 血糖采用葡萄糖氧化酶法测定; 血脂(TG 和 TC)按照试剂盒说明以比色法测定(中生北控生物科技股份有限公司, 北京); 胰岛素采用小鼠胰岛素超敏 ELISA 试剂盒测定(80-INSUMSU-E01, Alpco, 美国).

(2) 口服葡萄糖耐量试验(Oral glucose tolerance test, OGTT). 动物禁食 4 h 后尾静脉取血测定 0 min 血糖. 然后口服灌胃给予葡萄糖溶液, 剂量为 2 g/kg, 糖负荷后 30, 60, 120 min 取血, 测定 0, 30, 60, 120 min 的血糖, 计算各组 AUC.

$AUC(mg \cdot dL^{-1} \cdot h^{-1}) = (BG_0 + BG_{30}) \times 15/60 + (BG_{30} + BG_{60}) \times 15/60 + (BG_{60} + BG_{120}) \times 30/60$, 其中 BG_0 , BG_{30} , BG_{60} 和 BG_{120} 代表给予葡萄糖负荷后 0, 30, 60, 120 min 的血糖.

(3) 肌肉组织中甘油三酯(TG)含量测定. 参考 Folch 等人^[16]报道的方法, 将 10 mg 肌肉组织以 0.1 mol/L 的醋酸溶液匀浆, 以氯仿-甲醇混合液提取肌肉组织脂质, 将含有脂质的氯仿层干燥, 以 10% Triton X-100 的异丙醇溶液溶解后, 按试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)说明书要求测定提取液中 TG 含量.

(4) 肌肉组织中线粒体酶活性检测. 参考 Hulver 等人^[17]报道的方法, 称取 50 mg 肌肉组织, 以 20 倍匀浆液(0.1 mol/L KH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 2 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), pH 7.2)匀浆. 柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)活性于 37℃ 的孵育液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.3, 0.12 mmol/L 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB), 0.6 mmol/L 草酰乙酸钠)中进行测定, 加入 3.0 mmol/L 乙酰辅酶 A 后, 每 10 s 测定 412 nm 处的吸光值 1 次, 共计 7 min, 计算吸光值变化量. 细胞色素 C 氧化酶 II (cytochrome c oxidase II, COXII)活性于 25℃ 的孵育液(0.03 mol/L 磷酸钾, 2 mg/mL 还原态细胞色素 C, 4 mmol/L 亚硫酸氢钠)中进行测定, 加入匀浆液样品后, 每 10 s 测定 550 nm 处的吸光值 1 次, 共计 5 min, 计算吸光值变化量. 结果以蛋白含量校正.

(5) 肌肉组织中线粒体 DNA 拷贝数测定. 参考文献^[18]报道方法, 检测线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)与细胞核 DNA 的相对量. 基因组 DNA 依据试剂盒说明书进行提取(NPK-10, 东洋纺, 日本). 实时荧光定量 PCR 使用 THUNDERBIRD

SYBR qPCR Mix 试剂盒(QPS-201, 东洋纺), 扩增采用两步法进行(ABI 7500, 美国), 条件为 Stage1: 94℃ 10 min, Stage2: 94℃ 10 s→60℃ 30 s→94℃ 10 s, 共 40 个循环. 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, *COI*)引物为: 5'-TGCTAGCCGCAGGCATTAC-3'(上游)和 5'-GGGT-GCCCAAAGAATCAGAAC-3'(下游). 核基因 NADH 脱氢酶(泛醌)黄素蛋白 2(NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, *NDUFV2*)引物为: 5'-CTTCCCCACTGGCCTCAAG-3'(上游)和 5'-CCAA-AACCCAGTGATCCAGC-3'(下游)^[19]. 结果使用 SDS 1.9.1 软件(ABI)软件进行分析, 计算每份样品中 *COI*/*NDUFV2* 的相对表达水平.

(6) 实时荧光定量 PCR. RNA 提取及反转录: 取肌肉组织约 100 mg, 用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)制备 RNA 样品. 用 everTra Ace qPCR RT master mix(FSQ-301, 东洋纺)试剂盒逆转录成 cDNA, 用 RNase-free 水稀释成 20 ng/μL 用于 RT-PCR 目的基因扩增. 扩增采用两步法进行(ABI 7500), 条件为 Stage1: 95℃ 30 s, Stage2: 95℃ 5 s→60℃ 30 s, 共 40 个循环. 结果使用 SDS 1.9.1 软件(ABI)软件进行分

析, 以管家基因 *Actin* 的表达量为内参, 计算每份样品中目的基因的表达水平. 引物序列如表 2 所示.

(7) 蛋白免疫印迹检测. 取肌肉组织约 200 mg, 加入 400 μL 含磷酸化酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 超声匀浆, 充分裂解, 冰浴放置 35 min, 期间适时混匀. 13400×g 离心 10 min. 吸取上清, 获得总蛋白样品. 上清与上样缓冲液混匀煮沸制备成蛋白电泳样品, 用蛋白质免疫印迹法检测目的蛋白表达变化. 取 20 μg 蛋白上样行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电泳结束后, 将蛋白电转移至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜; 用 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, 孵一抗 4℃摇床过夜. 次日将膜取出, TBST 洗涤 3 次, 以辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 加入 ECL 超敏化学发光液上机检测. 应用 Image Lab 软件进行灰度分析, 并以 Tubulin 条带标准化. *SIRT1* 抗体(#2493, CST, 美国), *PGC1α*抗体(#sc-13067, Santa Cruz, 德国), *AMPK* 和 *P-AMPK* 抗体(#2531 和 #2532, CST), *Tubulin* 抗体(#5568, CST).

表 2 引物列表^{a)}

序号	名称	上游引物(3'→5')	下游引物(5'→3')
1	<i>Sirt1</i>	TGAAGCTGTTCGTGGAGATATTTTT	CATGATGGCAAGTGGCTCAT
2	<i>PGC1α</i>	TGGAGTGACATAGAGTGTGCTG	TATGTTTCGCGGGCTCATTGT
3	<i>PPARα</i>	GTCCTCTGGTTGTCCCTTG	GTCAGTTCACAGGGAAGGCA
4	<i>PPARβ/δ</i>	GTATCCGCAAGCCCTTCAGT	GATGGCGGCAATGAAAAGGG
5	<i>Foxo1</i>	CAGGCCGGAGTTTAACCACT	CTCGCTCTTCTAGCAGGC
6	<i>ERRα</i>	GGTGGCCGACAGAAGTACAA	GGCGTACAGCTTCTCAGGTT
7	<i>TFAM</i>	TTCCAGGGGGCTAAGGATGA	CACACTGCGACGGATGAGAT
8	<i>LCAD</i>	CCCTGGTTTCAGCCTCCATT	TCACTCCCAGACCTTTTGGC
9	<i>MCAD</i>	AGCCTTCACCGGATTCATCG	AGCCCCCATGCAATCTTGA
10	<i>PDK4</i>	TATCGACCCCAACTGCGATG	TGGATTGGTTGGCCTGGAAA
11	<i>CytC</i>	TCATGCCTGATTGGGAGTGG	ACAGCTTAAGTTTGCCAACCA
12	<i>CS</i>	TTGGGGCAATTGACTCTAAGC	GTGGCTTGTGTGGGCACTTA
13	<i>ATP5g1</i>	GGAGTGGGAGTGCAGATTGAA	TGGTACAGGAGCGGATCAGA
14	<i>HK2</i>	CTGGTGAGCCATCGTGGTTA	AAGCAGGCGATCATATGCGA
15	<i>PFKFB3</i>	CGCAATAGTGTACCCCCACT	TCCCTAGCAAAGGTTGTCCG
16	<i>Actin</i>	CGTCTTCCCTCCATCGT	GGAGTCCTTCTGACCCATACC

a) *CEBPα*: CCAAT 增强子结合蛋白α; *ERRα*: 雌激素受体相关蛋白α; *FOXO1*: 叉头转录因子 1; *HK2*: 己糖激酶 2; *LCAD*: 长链乙酰辅酶 A 脱氢酶; *MCAD*: 中链乙酰辅酶 A 脱氢酶; *PDK4*: 丙酮酸脱氢酶激酶 4; *PFKFB3*: 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 同工酶 3; *PGC1α*: 过氧化物酶体增殖激活受体 γ 共激活因子 1α; *PPARα*, *PPARβ/δ*: 过氧化物酶体增殖激活受体-α, -β/δ; *SIRT1*: NAD 依赖蛋白去乙酰化酶 1; *TFAM*: 线粒体转录因子; *CytC*: 细胞色素 C; *CS*: 柠檬酸合酶

1.4 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验和 ANOVA 分析. $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠糖脂代谢和胰岛素抵抗的影响

如图 1 所示, 与正常 *db/m⁺* 小鼠比较, *db/db* 小鼠体重和附睾脂肪重量显著升高(均为 $P < 0.001$); 同时存在明显的空腹血糖和糖耐量异常, 表现为空腹血

糖水平升高($P < 0.001$), 糖耐量中各时间点血糖水平升高($P < 0.001$); *db/db* 小鼠血清中 TG 水平与 *db/m⁺* 小鼠相比有升高趋势; *db/db* 小鼠空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平较 *db/m⁺* 小鼠显著升高($P < 0.001$), 胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)显著降低($P < 0.001$); *db/db* 小鼠糖负荷后 30 min 胰岛素分泌与血糖变化比值($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$)显著降低($P < 0.001$). 以上结果提示, *db/db* 小鼠存在明显的肥胖、糖代谢紊乱、IR 和胰岛功能损伤, 是一种具有典型的胰岛素抵抗性 2 型糖尿病的实验动物模型.

与 CON 组相比, 能量限制干预 8 周可显著改善 *db/db* 小鼠的肥胖、糖代谢紊乱和 IR, 表现为降低体

图 1 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠空腹血糖(A)、空腹血脂(B)、口服葡萄糖耐量(C)、胰岛素敏感性(D)、胰岛素生成指数(E)和肥胖(F)的影响

$n=10$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ vs. 对照组

重($P<0.05$)和附睾脂肪质量($P<0.05$), 降低空腹血糖($P<0.05$), 降低糖耐量中各时间点血糖水平($P<0.05$), 降低 FINS 水平($P<0.05$), 升高 ISI($P<0.001$). 同时, 能量限制干预还可显著升高 $\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$ 水平, 提示能量限制可改善 *db/db* 小鼠胰岛 β 细胞功能.

糖耐康干预 8 周对 *db/db* 小鼠体重、附睾脂肪质量、空腹血糖水平有一定程度的降低作用, 但无显著性差异. 与能量限制相似, 糖耐康可显著降低 *db/db* 小鼠糖负荷后 30 min 的血糖水平($P<0.05$), 改善糖耐量异常; 显著降低 FINS($P<0.01$), 升高 ISI($P<0.05$), 升高 $\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$ 水平($P<0.01$), 提示糖耐康可显著改善 *db/db* 小鼠的糖耐量、IR 和胰岛 β 细胞功能.

2.2 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉脂质沉积、mtDNA 含量和线粒体功能的影响

如图 2 所示, 与正常 *db/m⁺* 小鼠比较, *db/db* 小鼠肌肉组织 TG 含量显著升高($P<0.001$); mtDNA 水平显著降低($P<0.001$); CS 和 COXII 酶活性显著降低(均为 $P<0.01$). 表明 *db/db* 小鼠肌肉组织脂质异位沉积, 并存在线粒体数量和功能异常.

与 CON 组相比, 能量限制干预 8 周可显著降低

图 2 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉甘油三酯含量(A)、线粒体 DNA 含量(B)、柠檬酸合成酶活性(C)和细胞色素 C 氧化酶 II 活性(D)的影响

$n=10$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ vs. 对照组. COXII: 细胞色素 C 氧化酶 II; CO1: 细胞色素 C 氧化酶亚基 1; NDUFV2: NADH 脱氢酶黄素蛋白 2

db/db 小鼠肌肉组织甘油三酯含量($P<0.01$), 显著升高 mtDNA 水平($P<0.01$), 对 CS 和 COXII 的活性无明显影响, 提示能量限制可减少 *db/db* 小鼠肌肉脂质沉积, 增加线粒体数量.

与能量限制相似地, 糖耐康干预 8 周可显著降低 *db/db* 小鼠肌肉 TG 含量($P<0.05$), 但对 *db/db* 小鼠肌肉 mtDNA 含量没有显著影响, 可显著升高 CS 和 COXII 的活性(均为 $P<0.05$), 表明糖耐康可显著改善 *db/db* 小鼠肌肉脂质沉积和线粒体质量.

2.3 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉糖脂代谢和线粒体功能相关基因的影响

如图 3 所示, 能量限制可显著上调线粒体功能和生物合成相关基因(*CytC*, *ATP5g3*, *CS*, *TFAM*)以及脂肪酸氧化相关转录调控因子(*SIRT1*, *PGC1 α* , *PPAR α* , *PPAR β/δ*)及其下游因子(*LCAD*, *PDK4*)的基因表达水平. 同时, 能量限制可显著降低 *db/db* 小鼠肌肉中糖酵解激活子 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase-3, *PFKFB3*)的基因表达水平, 对己糖激酶 2(hexokinase 2, *HK2*)的表达无影响.

与 CON 组相比, 糖耐康对线粒体功能相关基因(*CytC*, *ATP5g3*, *CS*)以及线粒体生物合成转录因子(*ERR α* , *FOXO1*, *TFAM*)等的表达无显著影响. 与能量限制相似地, 糖耐康可显著增加与脂肪酸氧化相关转录调控因子(*SIRT1*, *PGC1 α* , *PPAR α* , *PPAR β/δ*)及其下游因子(*MCAD*, *LCAD* 和 *PDK4*)的基因表达水平. 显著降低 *db/db* 小鼠肌肉中 *PFKFB3* 的基因表达水平, 对 *HK2* 的表达无影响.

2.4 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉 AMPK/SIRT1/ PGC1 α 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与 CON 组比较, 能量限制干预以及糖耐康治疗 8 周后可显著增加 *db/db* 小鼠肝脏中 AMPK 的磷酸化水平($P<0.01$; $P<0.001$), 并上调 PGC1 α 和 SIRT1 的蛋白表达水平(均为 $P<0.05$).

3 讨论

本研究首先从整体水平评价了糖耐康和能量限制对自发性 2 型糖尿病 *db/db* 小鼠肥胖、糖脂代谢和胰岛素抵抗的影响, 结果表明, 与 CON 组相比, 糖

耐康和能量限制干预 8 周均可显著降低 *db/db* 小鼠 FINS, 升高 ISI, 改善糖耐量异常和糖刺激的胰岛素分泌, 降低肌肉组织 TG 含量. 此外, 能量限制还可显著降低 *db/db* 小鼠的体重、附睾脂肪重量和空腹血糖, 与目前对能量限制生理作用的研究报道相符^[2]. 本课题组前期研究结果显示, 糖耐康对 SHR-cp 大鼠胰岛素抵抗和代谢综合征的改善可能是继发于减重和降脂效应^[14]. 本实验中糖耐康虽可显著降低肌肉组织脂质含量, 但减重和降血脂作用不显著, 原因可能与动物种属差异有关. 以上结果表明, 糖耐康和能量限制可不同程度地改善 *db/db* 小鼠的糖代谢紊乱、胰岛素抵抗和胰岛功能; 糖耐康可在一定程度上模

拟能量限制的生理效应.

在能量限制状态下, 机体可通过增加脂肪酸氧化, 抑制无氧酵解等途径, 将能量底物由葡萄糖转变为脂肪酸, 提高能量代谢效率^[4-6]. 糖耐康和能量限制均可显著上调肌肉组织 *SIRT1* 和 *PGC1 α* 的基因和蛋白表达水平; 增加肌肉组织中 AMPK 的磷酸化水平, 表明糖耐康和能量限制可能激活 *db/db* 小鼠的 *SIRT1*-AMPK 信号通路. 相应地, 糖耐康和能量限制干预的 *db/db* 小鼠肌肉组织中, 调控脂肪酸氧化的关键转录因子 PPAR α , PPAR β/δ 及其下游靶基因 *LCAD* 和 *PDK4* 的表达水平显著升高, 表明糖耐康和能量限制可诱导 *db/db* 小鼠肌肉组织脂肪酸氧化相关基因表

图3 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉组织中线粒体功能(A)、糖酵解(B)、转录调控(C)和脂肪酸氧化(D)相关基因表达水平的影响

以 tubulin 为内参($n=5$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ vs. 对照组

图4 糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠肌肉组织 AMPK 磷酸化以及 PGC1 α 和 SIRT1 蛋白表达水平的影响

($n=3-4$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ vs. 对照组. AMPK: AMP-activated protein kinase

达。糖耐康和能量限制对上述脂肪酸氧化关键基因和蛋白的调节与其对 *db/db* 小鼠肌肉脂质异位沉积的改善作用相一致, 与目前对 SIRT1-AMPK 信号通路的研究报道和本课题组前期研究结果相符^[4,14,20], 提示糖耐康和能量限制对 *db/db* 小鼠的胰岛素抵抗的改善作用与其激活肌肉组织 SIRT1-AMPK 信号通路, 诱导脂肪酸氧化基因表达, 改善肌肉脂质异位沉积有关。糖耐康和能量限制还可显著降低 *db/db* 小鼠肌肉组织中糖酵解关键因子 *PFKFB3* 的基因表达水平, 提示糖耐康和能量限制可能在一定程度上抑制 *db/db* 小鼠肌肉的糖酵解代谢。以上结果表明, 糖耐康对 *db/db* 小鼠能量代谢的转录调控模式与能量限制状态下机体的代谢调控方式相类似。

除了调控脂肪酸氧化相关基因表达, 能量限制状态下, SIRT1 和 AMPK 信号通路的激活还可通过调节 PGC1 α 的活性, 直接或间接地提高线粒体生物合成和氧化磷酸化功能。活化的 PGC1 α 作为一个共转录激活因子, 通过与叉头蛋白转录因子 1(forkhead transcription factor 1, FOXO1) 和雌激素相关受体 α (estrogen related receptor α , ERR α) 等转录因子的相互作用, 进而激活线粒体转录因子(mitochondrial transcription factor, TFAM), 诱导 mtDNA 的复制和转录^[21]。本实验中, 能量限制可显著上调 mtDNA 含量以及线粒体相关基因的表达水平(TFAM, *CytC*, *ATP5g3*, *CS*), 但对线粒体酶活性(*CS*, *COXII*)没有明显影响; 糖耐康可显著上调线粒体酶活性(*CS*, *COXII*), 但对 mtDNA 含量和线粒体功能基因表达无明显影响。由此可见, 尽管糖耐康在 *db/db* 小鼠体内可以激活 SIRT1-AMPK 信号通路, 但其对 PGC1 α 依赖的线粒体生物合成关键基因表达的影响却较为微弱, 糖耐康对 PGC1 α 的选择性激活作用表明可能还

有其他的信号通路共同参与糖耐康对 *db/db* 小鼠能量代谢的调控。

中医药在胰岛素抵抗的防治方面有着不可取代的优势, 但目前干预胰岛素抵抗中药的药效和机制研究大多仍停留在对降糖降脂以及少数靶点的印证上, 缺乏对药物作用“模式”和新机制的创新性研究。本研究基于胰岛素抵抗的发病机制的细胞器理论——能量过剩引发脂质代谢和线粒体功能障碍, 通过比较复方糖耐康和能量限制干预胰岛素抵抗作用方式的异同, 首次提出中药复方可能通过在整体和分子水平模拟能量限制效应改善胰岛素抵抗。从新的视角揭示复方糖耐康干预胰岛素抵抗的分子机制和“药效模式”。

综上所述, 糖耐康可显著改善 2 型糖尿病 *db/db* 小鼠的糖代谢紊乱和胰岛素抵抗。糖耐康可能通过激活 SIRT1/AMPK/PGC1 α 能量代谢通路, 诱导脂肪酸氧化相关基因表达, 增强线粒体功能发挥代谢益处, 其作用特点和机制与能量限制效应相似(表 3), 有望用于胰岛素抵抗相关疾病, 如 2 型糖尿病和代谢综合征的预防和治疗。

表 3 糖耐康和能量限制效应的比较^{a)}

	能量限制	糖耐康
体重	↓	↓ ≠
肌肉甘油三酯	↓	↓
脂肪重量	↓	↓ ≠
空腹血清胰岛素	↓	↓
胰岛素敏感性	↑	↑
线粒体密度	↑	≠
线粒体功能	≠	↑
脂肪酸氧化	↑	↑

a) ↓: 下调; ↑: 上调; ≠: 相似

参考文献

- 1 Fisher-Wellman K H, Neuffer P D. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23: 142–153
- 2 Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev*, 2013, 27: 2072–2085
- 3 Liu J, Shen W, Zhao B, et al. Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: hope from natural mitochondrial nutrients. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 1343–1352
- 4 Chang H C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25: 138–145
- 5 Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007, 404: 1–13
- 6 Canto C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector. *Physiology (Bethesda)*, 2011, 26: 214–224
- 7 Bronner M, Hertz R, Bar-Tana J. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by

- AMP-activated protein kinase. *Biochem J*, 2004, 384: 295–305
- 8 Jager S, Handschin C, St-Pierre J, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12017–12022
- 9 Barroso E, Eyre E, Palomer X, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) agonist GW501516 prevents TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81: 534–543
- 10 Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD $^{+}$ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009, 458: 1056–1060
- 11 Canto C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20: 98–105
- 12 Ingram D K, Roth G S. Calorie restriction mimetics: can you have your cake and eat it, too. *Ageing Res Rev*, 2015, 20: 46–62
- 13 刘铜华. 中药糖耐康干预糖耐量异常及胰岛素抵抗研究. *中国科技成果*, 2011, 12: 79
- 14 Li L, Yoshitomi H, Wei Y, et al. Tang-Nai-Kang alleviates pre-diabetes and metabolic disorders and induces a gene expression switch toward fatty acid oxidation in SHR. Cg-Leprcp/NDmcr rats. *PLoS One*, 2015, 10: e0122024
- 15 刘铜华. 糖耐康颗粒及其制备工艺. 中华人民共和国专利, 02153751.8, 2004-06-16
- 16 Folch J, Lees M, Sloane S G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957, 226: 497–509
- 17 Hulver M W, Berggren J R, Carper M J, et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab*, 2005, 2: 251–261
- 18 Guo W, Jiang L, Bhasin S, et al. DNA extraction procedures meaningfully influence qPCR-based mtDNA copy number determination. *Mitochondrion*, 2009, 9: 261–265
- 19 Amthor H, Macharia R, Navarrete R, et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1835–1840
- 20 Ruderman N B, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2013, 123: 2764–2772
- 21 Scarpulla R C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, 2008, 88: 611–638

Tang-Nai-Kang mimics calorie restriction effects and alleviates insulin resistance in diabetic *db/db* mice

LI LinYi^{1,2}, WU XinLi¹, QIN LingLing¹, WANG HaiYan¹, JIANG YueYing¹, SUN Wen¹, WU LiLi¹, LV CuiYan³, XU GuangYuan¹, DENG Li¹, XU TunHai¹, WEI Ying¹ & LIU TongHua¹

1 Beijing Key Laboratory of the Health-Cultivation, Health-cultivation Laboratory of the Ministry of Education, Beijing International Technology Cooperation Base for Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus with Chinese Medicine,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 Key Laboratory of Upper Airway Dysfunction-related Cardiovascular Diseases, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Disease, Beijing An Zhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China;

3 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China

Increased energy intake and reduced physical activity have led to the elevated prevalence of insulin resistance and type 2 diabetes. Transcriptional modulation of metabolic network to mimic calorie restriction (CR) has become a focus of current drug discovery research on the prevention and treatment of metabolic disorders associated with energy surplus and insulin resistance. We report that Tang-Nai-Kang (TNK), a mixture of extracts from five Chinese traditional herbs, and CR protect against glucose intolerance, dyslipidemia and insulin resistance in *db/db* mice. The beneficial effects of TNK and CR were associated with the induction of a gene expression required for fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative phosphorylation through the elevation of protein expression of sirtuin 1 (SIRT1) and PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the skeletal muscle of *db/db* mice. These findings provide *in vivo* molecular evidence demonstrating that TNK can mimic CR effects and ameliorate insulin resistance by transcriptionally modulating a metabolic network controlling fatty acid oxidation and mitochondrial function through the activation of SIRT1 and AMPK signaling.

Tang-Nai-Kang, calorie restriction, insulin resistance, mitochondrial function

doi: 10.1360/N052016-00022