

越鞠丸对代谢综合征模型大鼠的治疗作用 及其对肝脏 AMPK- α 表达的影响

杨红莲 张 丽 段玉红

(陕西中医学院附属医院, 陕西咸阳 712000)

摘 要 目的:研究越鞠丸对代谢综合征大鼠肝脏-磷酸腺苷激活的蛋白激酶- α (AMPK- α)表达的影响。方法:大鼠随机分为正常对照组、模型组、越鞠丸大剂量组、越鞠丸小剂量组、二甲双胍组,除正常对照组以外,其余各组用高脂饲料诱导代谢综合征大鼠模型,8周后各药物组分别灌胃相应药物,正常对照组和模型组给予等量生理盐水,连续灌胃4周。观察并比较各组大鼠体重、血压与空腹血糖、血脂水平和肝脏 AMPK 表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠体重、血压、空腹血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)水平明显升高($P<0.05$),肝脏磷酸化 AMPK- α (P-AMPK- α)表达水平明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,越鞠丸组大鼠血压、空腹血糖、TG、TC、LDL-C 明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),P-AMPK- α 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结论:越鞠丸能改善代谢综合征大鼠代谢紊乱症候群,其上调 P-AMPK- α 蛋白的表达是其可能的作用机制。

关键词 越鞠丸 代谢综合征 肝 AMPK- α 血脂 SD 大鼠

中图分类号 R589.905

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2015)05-0077-03

代谢综合征(MS)是多种代谢成分异常聚集的病理状态,是一组复杂的代谢紊乱症候群。本病因病机尚不明确,目前多数学者认为能量代谢失衡是 MS 的主要病因^[1]。磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)是调节全身能量平衡的关键因素,不仅可以在细胞水平作为能量感受器,还可以通过激素和细胞因子来参与调节机体的能量代谢^[2-4],提示 AMPK 有可能在预防机体发生代谢性疾病中起重要作用^[5]。中医认为,“郁”是 MS 的核心病机,并且贯穿其病理变化的始终,对其发生发展均有影响。越鞠丸能行气解郁,主治各种因素导致的郁,其所治病症与 MS 十分吻合。目前临床已将越鞠丸广泛应用于治疗肥胖、高血压病、糖尿病等疾病,均取得了较好的疗效^[6-9]。本研究试图以 AMPK 为切入点研究越鞠丸治疗 MS 的机理,从而为临床上提供药效机理明确的治疗药物。

1 实验材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠,体重(160±8)g,由第四军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK 军 2013-009 号。

1.2 试剂 GLU 检测试剂盒(批号 512051),TG 检测试剂盒(批号 506051),TC 检测试剂盒(批号 0707031),HDL-C 和 LDL-C 试剂盒(批号 0707041、0707042),均为北京利德曼生化技术有限

公司产品。PVDF 膜(MilliPore,USA),Rabbit Anti-AMPK Polyclonal Antibody (Cell Signaling,USA),Rabbit Anti-Phospho-AMPK Polyclonal Antibody (Cell Signaling,USA)。

1.3 仪器 贝克曼 CX4 型全自动生化分析仪,电子天平,沈阳龙腾电子有限公司生产。TDL-5 型高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂生产。大鼠动脉血压测量仪,正华生物仪器设备有限公司生产。

1.4 药物 越鞠丸(北京同仁堂制药有限公司,批号:131016),用万能粉碎机粉碎,每次称取 110g 用生理盐水配置成 0.42g/mL,置于冰箱 4℃保存,用时温水加热至常温,小剂量稀释成 0.21g/mL。盐酸二甲双胍片,深圳市中联制药有限公司生产,批号:1201060。

2 实验方法

2.1 造模与分组、给药 随机将大鼠分为正常对照组及造模组,正常对照组给予饲料+自来水喂养,造模组给予高盐高脂饲料(普通饲料 63%,猪油 20%,蛋黄 5%,食用盐 10%,胆固醇 2%)+30%的果糖水喂养,造模共 8 周。8 周后以大鼠体重、尾动脉收缩压、空腹血糖、血脂水平(TG、TC、LDL-C 和 HDL-C)为观察指标,确定造模成功。造模成功的大鼠随机分为模型组、二甲双胍组(0.15g/kg)和越鞠丸大、小

基金项目:陕西省教育厅科学研究项目计划(12JK1030)

剂量组(4.2g/kg 和 2.1g/kg), 每组 10 只。分组后, 正常对照组继续给予大鼠饲料+自来水, 其余各组大鼠给予高盐高脂饲料+30%果糖水。同时各药物组按照 1mL/100g 灌胃给予相应药物, 正常对照组和模型组给予等量生理盐水, 连续灌胃 4 周。

2.2 血清、肝组织收集 各组大鼠于末次给药后, 禁食不禁水 12h, 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(0.1mL/100g), 腹主动脉取血, 取血后迅速摘取肝脏, 动脉血液室温静置 20min, 4℃, 3500r/min 离心 10min, 分离血清, 分装冻存于-80℃冰箱以备检测生化指标。收集肝脏, 滤纸吸干, 分装于冻存管中, 做好标记迅速置于液氮罐中以便提取蛋白质。

2.3 大鼠 MS 相关指标测定 麻醉取血前, 称量各组动物体重, 测量大鼠尾动脉血压。用全自动生化分析仪检测大鼠血清空腹血糖、血脂水平。

2.4 肝脏组织 AMPK- α 、磷酸化 AMPK- α (P-AMPK- α) 蛋白测定 从液氮中取出约 100mg 肝脏组织, 充分裂解, 4℃、12000g $\times$ 5min 离心, 吸取上清, 采用 BCA 法测定肝脏组织的蛋白含量。制备 8%SDS-PAGE 凝胶, 进行电泳, 转膜, 染色, 封闭。用抗 AMPK- α 抗体(1:1000)、抗 P-AMPK(Thr172)抗体、抗 GAPDH 抗体(1:3000)4℃孵育过夜; TBS-T 洗涤 PVDF 膜 3 次 $\times$ 5min, 分别用对应辣根过氧化物酶标记二抗(1:5000), 室温孵育 1h; TBS-T 洗涤 PVDF 膜 3 次 $\times$ 5min, 滤纸吸干水分, 加上发光液, 于暗室曝光, 在 X 光片上显影。Western blot 结果使用光密度测量仪扫描, 使用 Quantity One 分析软件进行灰度值比较。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 数据采用($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 治疗后各组大鼠体重、血压及血糖比较 与正常对照组比较, 模型组大鼠体重、血压、空腹血糖均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, 越鞠丸大剂量组大鼠血压明显降低($P<0.05$); 越鞠丸大、小剂量组及二甲双胍组空腹血糖水平明显降低($P<0.05$)。越鞠丸大、小剂量组大鼠体重、血压、空腹血糖与二甲双胍组比较无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体重、血压及空腹血糖比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	体重 (g)	血压 (mmHg)	空腹血糖 (mmol/L)
正常对照组	10	306.7 $\pm$ 22.85	100.1 $\pm$ 8.19	5.49 $\pm$ 0.71
模型组	10	328.4 $\pm$ 21.42 [△]	109.5 $\pm$ 9.08 [△]	6.31 $\pm$ 0.78 [△]
二甲双胍组	10	312.6 $\pm$ 17.20	105.2 $\pm$ 7.77	5.43 $\pm$ 0.87*
越鞠丸大剂量组	10	309.7 $\pm$ 20.67	100.6 $\pm$ 9.49*	5.48 $\pm$ 0.77*
越鞠丸小剂量组	10	315.0 $\pm$ 24.17	106.5 $\pm$ 12.5	5.51 $\pm$ 0.88*

注: 与正常对照组比较, $\Delta P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$ 。

3.2 治疗后各组大鼠血脂指标比较 与正常对照组比较, 模型组大鼠甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)水平均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, 越鞠丸大剂量组大鼠 TG、TC、LDL-C 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 越鞠丸小剂量组 TG、TC 水平明显降低($P<0.05$), 二甲双胍组 TC、LDL-C 水平明显降低($P<0.05$)。越鞠丸大、小剂量组各血脂指标与二甲双胍组比较均无统计学差异($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血脂指标比较($\bar{x}\pm s$) mmol/L

组别	动物数(只)	TG	TC	HDL-C	LDL-C
正常对照组	10	1.32 $\pm$ 0.50	1.49 $\pm$ 0.29	1.03 $\pm$ 0.17	0.6 $\pm$ 0.14
模型组	10	1.80 $\pm$ 0.43 [△]	1.82 $\pm$ 0.28 [△]	0.95 $\pm$ 0.19	0.73 $\pm$ 0.11 [△]
二甲双胍组	10	1.36 $\pm$ 0.51	1.51 $\pm$ 0.30*	0.85 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.12*
越鞠丸大剂量组	10	1.31 $\pm$ 0.56*	1.29 $\pm$ 0.39**	0.91 $\pm$ 0.18	0.63 $\pm$ 0.09*
越鞠丸小剂量组	10	1.26 $\pm$ 0.52*	1.45 $\pm$ 0.33*	0.86 $\pm$ 0.16	0.68 $\pm$ 0.11

注: 与正常对照组比较, $\Delta P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.3 治疗后各组大鼠肝脏 AMPK- α 和 P-AMPK- α 蛋白水平比较 与正常对照组比较, 模型组大鼠 P-AMPK- α 表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 越鞠丸大、小剂量组 P-AMPK- α 表达水平明显升高($P<0.05$)。越鞠丸大、小剂量组 AMPK- α 、P-AMPK- α 表达水平与二甲双胍组比较无统计学差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肝脏 AMPK- α 和 P-AMPK- α 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	AMPK- α	P-AMPK- α
正常对照组	10	0.92 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.22
模型组	10	0.82 $\pm$ 0.19	0.73 $\pm$ 0.15 [△]
二甲双胍组	10	1.00 $\pm$ 0.25	0.88 $\pm$ 0.18
越鞠丸大剂量组	10	0.93 $\pm$ 0.14	0.92 $\pm$ 0.16*
越鞠丸小剂量组	10	0.99 $\pm$ 0.24	0.89 $\pm$ 0.16*

注: 与正常对照组比较, $\Delta P<0.05$; 与模型组比较, * $P<0.05$ 。

4 讨论

中医学认为素体肥胖, 或饮食不节, 嗜食肥甘厚味, 损伤脾胃, 酿生痰湿, 阻滞气机, 化瘀阻络, 致使 MS 成为以痰、瘀、热为标, 脾肾亏虚、肝阳偏亢为本的顽证, 故认为气郁、血郁、痰郁、火郁、湿郁、食郁是导致 MS 的主要病机。上述论述恰恰与朱丹溪“六郁”理论相一致。越鞠丸是朱丹溪根据“六郁”之说创立的方剂, 方名“越鞠”具发越鞠郁之气的涵义, 主治气、血、痰、火、湿、食等郁, 由苍术、香附、川芎、神曲、梔子五药组成。香附行气解郁, 以治气郁, 为君药; 苍术燥湿运脾, 以治湿郁; 川芎活血化瘀, 以治血郁; 梔子清热泻火, 以治火郁; 神曲消食导滞, 以治食郁。五味中药可分别针对 MS 早期诸邪进行协同干预。我们选用二甲双胍作为阳性对照药,

主要因为目前研究表明二甲双胍对 MS 具有全面的调节作用,除了具有降糖、增强胰岛素敏感性、改善脂代谢紊乱、降低血压等作用外^[10-11],还可以增加大鼠 AMPK- α 的表达及活性^[12-13]。

2005 年国际糖尿病联盟(IDF)颁布的人 MS 诊断标准,即在中心型肥胖基础上,伴有胰岛素抵抗或空腹血糖受损/糖耐量异常、高血压、低 HDL 和高 LDL 血症等其中两项者,判定为 MS。动物 MS 成模与否亦参考上述标准,其中是否符合中心型肥胖指标主要通过测量大鼠体重和腹围判定。本实验结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠体重、血压、空腹血糖及血清 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高,且估测模型组大鼠腹围大于正常对照组,提示造模成功。与模型组比较,越鞠丸大、小剂量可不同程度降低上述指标,表明越鞠丸对 MS 具有一定的治疗作用。

AMPK 是近年发现的一种调节机体糖、脂肪和蛋白质代谢的重要蛋白分子。研究表明,当 AMP/ATP 的比值升高时,AMPK 可磷酸化激活大量的下游靶分子,从而减少 ATP 的利用,增加 ATP 的产生,使细胞的分解代谢增加,反之则细胞合成代谢增加。在哺乳动物中,AMPK 的组成包括 α 、 β 、 γ 三个亚单位,是一个三聚体结构。其中 α 亚单位起催化作用,而 β 和 γ 亚单位起调节作用。 α 亚单位的数个位点均可被磷酸化,其中苏氨酸 172 位点及其磷酸化对 AMPK 活性的调节起重要作用^[14]。研究中所检测的总 AMPK 及活性 AMPK 蛋白通常是指其 α 亚单位。实验结果显示,与正常对照组比较,模型组肝组织 P-AMPK- α 蛋白表达水平明显下降;与模型组比较,越鞠丸大、小剂量组 P-AMPK- α 表达水平均明显升高,表明越鞠丸对 P-AMPK- α 蛋白表达水平具有一定的干预作用。

近年来,诸多医者虽有使用越鞠丸治疗 MS 并取得比较满意的临床效果,然而至今尚未有学者能够阐明越鞠丸治疗 MS 的作用机制。此次实验结果表明,越鞠丸各剂量组可不同程度降低 MS 大鼠血压、空腹血糖、血脂水平,增加 MS 大鼠肝脏组织 P-AMPK- α 蛋白表达,故初步推测越鞠丸通过激活 AMPK 防治 MS 的发生发展。课题组下一步将围绕 AMPK 及其信号通路深入研究越鞠丸治疗 MS 的作用机理,从而为临床防治 MS 提供药效显著、作用机理明确的有效中药。

参考文献

- [1] 解雪芬,朱毅.AMPK 与代谢综合征.基础医学与临床,2006,26(1):27
- [2] 刘金凤,彭红丽.黄芩苷对链脲佐菌素诱导的糖尿病模型

大鼠血糖和血脂及腺苷酸活化蛋白激酶的影响.中国药理学与毒理学杂志,2011,25(2):145

- [3] Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG, et al. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287: E310
- [4] Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Curr Biol, 2003, 13: 2004
- [5] Fryer LG, Carling D. AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. Biochem Soc Trans, 2005, 33: 362
- [6] 卢惠琴,董学芳.越鞠丸合二陈汤治疗肥胖型糖耐量异常 58 例.陕西中医, 2008, 29(6): 682
- [7] 李素琴. 越鞠丸加减治疗 2 型糖尿病 68 例疗效观察.山西中医学院学报, 2009, 10(6): 54
- [8] 孙素芹. 越鞠丸加减治疗高脂血症 44 例临床观察.上海中医药杂志, 2008, 42(1): 35
- [9] 任昌伟. 越鞠丸化裁治疗痰浊内盛型高血压病疗效观察.河南中医, 2005, 25(9): 67
- [10] 杨萍土. 简明实验动物学. 上海: 复旦大学出版社, 2003: 143
- [11] 李建生, 赵敏, 余海滨, 等. 代谢综合征大鼠模型的建立与评价及增龄因素的影响. 中国老年学杂志, 2005, 25(12): 1490
- [12] Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS. The antidiabetic drug metformin inactivates the AMP-activated Protein kinase case evedia an adenine nucleotide-independent mechanism. Diabetes, 2002, 51: 2420
- [13] Zheng DH, Mac Lean PS, Pohnert SC. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated Protein kinase. J Appl Physiol, 2001, 91: 1073
- [14] Xue B, Kahn B. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. J Physiol, 2006, 574: 73

第一作者: 杨红莲(1980—), 女, 药学博士, 副主任药师, 研究方向: 防治代谢性疾病的中药研究。465134440@qq.com

收稿日期: 2014-12-12

编辑: 吴 宁

