

山柰酚对 2 型糖尿病小鼠骨骼肌 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路的影响*

张 茁¹, 孙 文², 刘铜华^{3**}, 郭 璇⁴, 候 丹¹, 许光远⁴, 吴丽丽², 秦灵灵⁵,
侯 毅⁴, 张 露⁴, 张程斐⁴

(1. 陕西中医药大学第一临床医学院 咸阳 712000; 2. 北京中医药大学教育部中医养生学
重点实验室 北京 100029; 3. 北京中医药大学研究生院 北京 100029;
4. 北京中医药大学东方医院 北京 100029; 5. 北京中医药大学科技处 北京 100029)

摘 要:目的:探讨山柰酚对 KKAy 小鼠骨骼肌 PI3K/AKT/GLUT4 信号通路的影响。方法:以自发型 2 型糖尿病 KKAy 小鼠为动物模型,通过对糖尿病小鼠进行为期 6 周的山柰酚灌胃给药治疗,利用生化、免疫组织化学及免疫印迹法等检验方法,检测 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路重要靶点的表达,探讨山柰酚改善糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌胰岛素敏感性及对胰岛素信号转导通路 PI3K-AKT-GLUT4 的影响。结果:山柰酚具有显著降低 KKAy 小鼠体重、空腹血糖、随机血糖的作用,ITT 实验结果说明:山柰酚能够显著降低胰岛素注射 30 min 时的血糖,显著降低 ITT 曲线下面积,改善胰岛素抵抗。此外,山柰酚能够显著上调 KKAy 小鼠骨骼肌 PI3K、AKT、GLUT4 基因的表达,能够上调 AKT、GLUT4 蛋白的表达。结论:山柰酚具有显著降低 KKAy 小鼠血糖、体重的作用,能够改善胰岛素抵抗,其作用机制可能与上调骨骼肌 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路有关。

关键词:山柰酚 2 型糖尿病 骨骼肌 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路 实验研究
doi:10.11842/wst.2016.07.009 中图分类号:R587.1 文献标识码:A

2 型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)是一类以胰岛素分泌相对不足和胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)为病理生理基础的代谢疾病,是目前糖尿病的主要类型^[1]。IR 的主要特征是组织器官对胰岛素的敏感性降低。骨骼肌是糖代谢受到胰岛素调控的重要作用部位,PI3K-AKT-GLUT4 信号通路是细胞内胰岛素信号传导的重要通路,与 IR 的发生密切相关^[2]。山柰酚(Kaempferol, KA)是从姜科植物山柰以及檀香科植物百蕊草中提取的黄酮类化合物^[3],具有降血糖、抑制肿瘤细胞增殖和抗氧化等作用,且不良反应较少,具有多种潜在药用价值^[4,5]。目

前,已有多项研究表明,山柰酚可用于治疗 T2DM,但具体机制尚不明确^[6]。本实验通过观察山柰酚对自发型 2 型糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路的影响来探讨其治疗 T2DM 改善 IR 的机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄雄性 KKAy 小鼠 12 只,同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只,购于中国医学科学院医学实验动物研究所,许可证号:SCXK(京)2009-0004,饲养于北京市动物实验中心 SPF 级动物实验室;温度 21-25℃、湿度 45%-65%,12/12 h 光照黑暗

收稿日期 2016-07-01

修回日期 2016-07-12

* 北京市教育委员会高校重大成果转化项目“糖调节受损保健食品产业化与社区与社区干预疗效与安全性评价研究”,负责人:刘铜华。

** 通讯作者:刘铜华,本刊编委,教授,博士生导师,主要研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究。

循环,自由摄食饮水。KKAy小鼠喂养全价高脂饲料(78.8%基础饲料、10.0%蛋黄粉、10.0%猪油、1.0%胆固醇、0.2%胆盐,由中国医学科学院实验动物研究所);C57BL/6J小鼠喂养普通全价营养颗粒鼠饲料。

1.2 仪器与试剂

血糖试纸、GT-1810血糖仪(日本京都公司,型号:GT1941);高脂饲料(中国医学科学院实验动物研究所,许可证号SCXK京-2009-0014);生物合成人胰岛素注射液(丹麦诺和诺德公司,批号:国药准字J20100117);PI3K、AKT、GLUT4、GAPDH mRNA引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;AKT、GLUT4抗体、 β -actin抗体(CST公司,批号分别为:0020、0006、0026);GoTaq[®] qPCR Master Mix(Thermo公司,批号:00076581);葡萄糖测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号:E1010);蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号:P1510);30%聚丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液(北京普利莱基因技术有限公司,批号:B1000);GLUT4一抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号:#2213);AKT一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-6951R)等;山柰酚(成都普瑞法科技有限公司,纯度>98%,批号:13060307)。

2 方法

2.1 分组与给药

KKAy小鼠适应性喂养1周后,连续3天于早晨7点测量小鼠随机血糖,连续3天血糖高于13.9 mmol·L⁻¹的动物即为2型糖尿病动物模型并入组,按体重和随机血糖随机分为模型组、山柰酚组;同周龄C57BL/6J小鼠6只为正常组。山柰酚组灌胃给药山柰酚水溶液50 mg·kg⁻¹(体重);模型组和正常组给以等剂量的生理盐水灌胃给药,1次/日,每天上午7:00-8:00点给药,连续给药6周。

2.2 一般情况检测

实验期间,观察小鼠精神状态、活动情况、毛色、进食、饮水量等,每周记录进食量、饮水量、体质量变化。

2.3 血糖水平

分别于0、3、6周检测小鼠空腹血糖水平,检测前12 h禁食不禁水,次日清晨断尾取血检测空腹血糖。分别0、3、6周末日清晨8:00段位取血检测各组小鼠随机血糖。

2.4 胰岛素耐量实验

给药6周后进行胰岛素耐量实验(Insulin Tolerance Test,ITT)实验,于早晨8:00禁食不禁水4 h,于当天中午12:00始腹腔注射短效胰岛素1 U·kg⁻¹(体质量),测定0、30、60、90、120 min血糖并绘制曲线,采用血糖仪断尾检测法测定血糖值。

2.5 RT-PCR检测骨骼肌PI3K、AKT、GLUT4 mRNA表达

取液氮冻存的骨骼肌组织,使用RNA提取试剂盒提取总RNA;进行反转录,向RNA中加入反转录引物,向10 μ L RNA/引物混合物中加入10 μ L GoScript[™]反应液,退火25-5 min,延伸42-1 h,灭活70-15 min,得到cDNA。RT-PCR 20 μ L反应体系,将2 μ L cDNA稀释液加入10 μ L GoTaq反应液、7.2 μ L Nuclease-Free Water和0.8 μ L引物混合物,置于Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System进行反应,反应条件:95-10 min,95-15 s,60-1 min(共40次循环);95-15 s,60-15 s溶解。反应条件参照说明书设定,再以内参校正,求得目的基因相对表达水平。引物序列如下:GAPDH上游引物5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3',下游引物5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3';PI3K上游引物5'-GCTCCTGGAAGCCATTGAGAA-3',下游引物5'-CGTCGATCATCTCCAAGTCCAC-3';AKT上游引物5'-CCCTTCTACAACCAGGACCA-3',下游引物5'-ATACACATCCTGCCACACGA-3';GLUT4上游引物5'-AACGGATAGGGAGCAGAAA CCCAA-3',下游引物5'-GTGCAAAGGGTGAGTGA GGCATTT-3'。

2.6 Western blot检测骨骼肌PI3K、AKT、GLUT4蛋白表达

取液氮冻存的骨骼肌,用预冷RIPA裂解液提取蛋白,加上样缓冲液,沸水浴5 min蛋白变性,制备凝胶,进行20 μ g上样,100 V电泳1.5 h,半干转膜转25 V 15 min,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加一抗(1:1 000稀释)4 h,孵育过夜,TBST洗涤10 min,3次,加二抗(1:10 000),室温1 h,TBST洗涤10 min,3次,加ECL发光液反应1 min,置于凝胶成像系统成像,蛋白条带用Image J 7.0图像分析。

2.7 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0软件进行组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),

$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 山柰酚对 KKAy 小鼠一般情况的影响

正常组 C57BL/6J 精神良好,活动自如,皮毛光泽。与正常组比较,KKAy 小鼠逐渐出现精神萎靡、动作缓慢、毛色欠佳、多尿等现象,并且体质量增加 ($P < 0.01$)。与正常组比较,山柰酚组小鼠以上状况得到改善,体质量显著降低 ($P < 0.01$) (表 1)。

3.2 山柰酚对 KKAy 小鼠血糖水平的影响

治疗 6 周后,与正常组小鼠相比,模型组空腹血糖、随机血糖显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ;与模型组比较,山柰酚组小鼠空腹血糖、随机血糖显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,说明山柰酚有降低 KKAy 小鼠

高血糖的作用(表 2、表 3)。

3.3 山柰酚对 KKAy 小鼠 ITT 的影响

治疗 6 周后,进行胰岛素耐量试验,与正常组小鼠相比,模型组小鼠在 ITT 各时间点血糖均显著升高 ($P < 0.01$) ;与模型组比较,山柰酚组在 30 min 血糖显著降低 ($P < 0.05$) ;AUC 结果显示山柰酚组显著低于模型组 ($P < 0.01$) ,说明山柰酚能够明显改善 KKAy 小鼠胰岛素抵抗(表 4)。

3.4 山柰酚对 KKAy 小鼠骨骼肌 PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达的影响

与正常组小鼠相比,模型组小鼠骨骼肌 PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$) ;与模型组比较,山柰酚组小鼠骨骼肌 PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$) ;说明山柰酚对胰岛素信号通路上关键分子 PI3K、AKT、GLUT4 的基因

表达具有调节作用(表 5)。

3.5 山柰酚对 KKAy 小鼠骨骼肌 AKT、GLUT4 蛋白表达量的影响

与正常组小鼠相比,模型组小鼠骨骼肌 AKT、GLUT4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$) ;与模型组比较,山柰酚组小鼠骨骼肌 AKT、GLUT4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$) ;说明山柰酚调节胰岛素信号通路上关键分子 AKT、GLUT4 蛋白表达(表 6、图 1)。

4 讨论

2 型糖尿病受遗传和环境因素共同决定,目前普遍认为胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR) 是其主要病因之一。骨骼肌作为糖代谢的主要外周组织,正常情况下胰岛素与细胞表面胰岛受体结合后激活受体底物,使其磷

表 1 山柰酚对 KKAy 小鼠体质量的影响 /g ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
正常组	20.60 ± 1.78	23.96 ± 3.24	23.57 ± 1.14	24.89 ± 0.84
模型组	30.43 ± 6.63**	33.63 ± 3.96**	37.40 ± 4.30**	40.36 ± 3.00**
山柰酚组	34.40 ± 1.71	35.10 ± 1.99	36.61 ± 2.20	37.11 ± 2.08#

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;下同。

表 2 山柰酚对 KKAy 小鼠空腹血糖水平的影响 /mmol · L⁻¹ ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	第 0 周	第 3 周	第 6 周
正常组	5.87 ± 1.83	4.39 ± 1.07	5.23 ± 0.65
模型组	10.73 ± 1.35**	12.01 ± 4.33**	12.07 ± 4.35**
山柰酚组	10.96 ± 1.78	8.93 ± 2.15	6.36 ± 0.53##

表 3 山柰酚对 KKAy 小鼠随机血糖水平的影响 /mmol · L⁻¹ ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	第 0 周	第 3 周	第 6 周
正常组	7.76 ± 0.61	6.21 ± 0.85	7.93 ± 1.48
模型组	31.59 ± 2.42**	30.33 ± 5.21**	32.37 ± 1.35**
山柰酚组	31.23 ± 2.26	29.73 ± 2.67	28.64 ± 2.81##

表 4 山柰酚对 KKAy 小鼠 ITT 的影响 /mmol · L⁻¹ ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	AUC
正常组	8.32 ± 0.44	3.26 ± 0.51	1.74 ± 0.69	2.20 ± 0.67	2.66 ± 0.80	380.70 ± 45.93
模型组	26.32 ± 3.91**	20.76 ± 3.86**	16.14 ± 3.20**	16.16 ± 2.93**	16.22 ± 3.26**	2230.20 ± 351.52**
山柰酚组	20.82 ± 8.83	11.64 ± 3.93#	13.5 ± 5.66	12.96 ± 5.49	12.74 ± 5.54	1646.60 ± 620.13##

酸化,进而激活 PI3K,激活后的 PI3K 可以催化 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇生成 PIP3,其作为第二信使激活 AKT,活化的 PI3K 和 AKT 触发富含葡萄糖转运蛋白 4 的囊泡向细胞表面转位,与细胞膜融合,细胞表面 GLUT4 数量增多,增强葡萄糖的摄取能力。GLUT4 一方面调节肌细胞对葡萄糖的摄取,另一方面通过抑制烯醇丙酮酸羧激酶而抑制糖异生,最终增加葡萄糖利用和糖原合成^[7]。当胰岛素信号传导通路的任一环节异常,骨骼肌对胰岛素的敏感性降低,骨骼肌细胞不能正常摄取利用葡萄糖,造成糖耐量异常,从而导致血糖水平升高。因此,骨骼肌细胞中胰岛素信号传导通路在 2 型糖尿病发病中至关重要。

山柰酚是由中药材中提取的黄酮类化合物,研究表明,山柰酚可降低癌症、心血管等疾病的风险,并且具有明显的降血糖作用^[8]。有研究表明,山柰酚能够降低糖尿病大鼠氧化应激水平,进而减少氧化应激产生的活性氧水平,达到保护胰岛细胞和功能的作用,减少胰岛 β 细胞凋亡,降低 caspase-3 酶活性,增加胰岛素分泌,从而起到降低血糖的作用^[9,10],其作用途径可能与 PI3K-AKT 信号通路相关^[11]。此外,山柰酚能够显著降低 STZ 造模糖尿病大鼠体内炎症反应水平^[12,13]。糖尿病胰岛素抵抗通常伴随脂代谢紊乱,后者又能进一步加重胰岛素抵抗,升高血糖,加重糖尿病并发症的发生。山柰酚具有降低血脂,改善脂代谢紊乱的作用^[14]。

动物实验结果显示,经过 6 周山柰酚治疗,本实验中自发性 2 型糖尿病动物 KKAY 小鼠小鼠体质量、空腹血糖、随机血糖均明显降低,ITT 实验结果显示,山柰酚组胰岛素敏感性显著增加,说明山柰酚具有降糖、改善 IR 的作用;胰岛素抵抗可以引起多

表 5 山柰酚对 KKAY 小鼠骨骼肌 PI3K、AKT、GLUT4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

分组	PI3K 相对表达量	AKT 相对表达量	GLUT4 相对表达量
正常组	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.15
模型组	0.16 ± 0.05**	0.51 ± 0.08**	0.27 ± 0.02**
山柰酚组	0.48 ± 0.07###	0.79 ± 0.19###	0.59 ± 0.12###

表 6 山柰酚对 KKAY 小鼠骨骼肌 AKT、GLUT4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

分组	AKT/ β -actin	GLUT4/ β -actin
正常组	1.12 ± 0.14	1.07 ± 0.21
模型组	0.34 ± 0.08**	0.47 ± 0.16*
山柰酚组	0.86 ± 0.12#	0.79 ± 0.12#

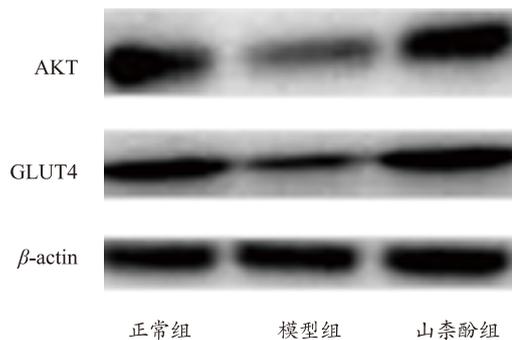


图 1 KKAY 小鼠骨骼肌 AKT、GLUT4 蛋白表达

种代谢紊乱,体质量增加,山柰酚具有降低体质量的作用。进一步检测发现,山柰酚上调骨骼肌中 PI3K、AKT、GLUT4 基因表达,上调 AKT、GLUT4 蛋白表达,说明山柰酚降低血糖、改善胰岛素抵抗的作用可能与其对骨骼肌 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路有关。

综上所述,山柰酚能够通过调节 PI3K-AKT-GLUT4 信号通路,增强骨骼肌糖代谢,改善糖尿病小鼠骨骼肌胰岛素抵抗。

参考文献

- 康学东,张瀚文,余臣祖. 黄金胶囊对糖尿病大鼠血糖和肝细胞 PI-3K、GLUT-4 蛋白表达的影响. 中医研究, 2016, 29(1): 50-54.
- 迟毓婧,李晶,管义飞,等. PI3K-Akt 信号传导通路对糖代谢的调控作用. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(10): 879-885.
- 张家瑞. 槲皮苷和山柰酚对糖尿病小鼠血糖及血脂水平的影响. 现代食品科技, 2013, 29(3): 459-462.
- 周瑶,杜标炎,谭宇蕙,等. 山柰酚对大鼠肝癌细胞 CBRH7919 的增殖抑制及诱导凋亡作用. 广州中医药大学学报, 2010, 27(3):

- 250–253.
- 5 刘贵波, 刘跃光, 孙成, 等. 山柰酚对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响. *实用临床医药杂志*, 2012, 16(9): 1–3.
 - 6 Adebayo A H, Tan N H, Akindahunsi A A, *et al.* Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Pharmacogn Mag*, 2010, 6(21): 62–66.
 - 7 李娟娥, 王磊, 孙文, 等. 匙羹藤对 2 型糖尿病 db/db 小鼠骨骼肌葡萄糖转运信号通路的影响. *现代中药研究与实践*, 2015, 29(3): 37–40.
 - 8 Lee Y J, Suh K S, Choi M C, *et al.* Kaempferol protects HIT-T15 pancreatic beta cells from 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage. *Phytother Res*, 2010, 24(3): 419–423.
 - 9 Suh K S, Choi E M, Kwon M, *et al.* Kaempferol attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative cell damage in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(4): 746–749.
 - 10 Rashid M A, Lee S, Tak E, *et al.* Carbonyl reductase 1 protects pancreatic beta-cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(10): 1522–1533.
 - 11 Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 325–332.
 - 12 Arkan M C, Hevener A L, Greten F R, *et al.* IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*, 2005, 11(2): 191–198.
 - 13 Arkan M C, Greten F R. IKK- and NF-kappaB-mediated functions in carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 349: 159–169.
 - 14 Da-Silva W S, Harney J W, Kim B W, *et al.* The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. *Diabetes*, 2007, 56(3): 767–776.

Effects of Kaempferol on the Skeletal Muscle of KKAY Mice via PI3K-AKT-GLUT4 Signaling

Zhang Zhuo¹, Sun Wen², Liu Tonghua³, Guo Xuan⁴, Hou Dan¹, Xu Guangyuan⁴, Wu Lili², Qin Lingling⁵, Hou Yi⁴, Zhang Lu⁴, Zhang Chengfei⁴

(1. College of Clinical Medical, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 100029, China;

2. Health-Cultivation Laboratory of the Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. School of Graduates, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

4. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

5. Department of Science and Technology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effects of kaempferol on the skeletal muscle of KKAY mice via PI3K-AKT-GLUT4 signaling. Spontaneous type 2 diabetic KKAY mice were made up for the model group. After 6-week treatment of kaempferol by intragastric administration, key targets of PI3K-AKT-GLUT4 signaling were detected using biochemical and immunohistochemical technique, and western blot. It was found that the body weight, fast blood glucose and random blood glucose were decreased after kaempferol administration. ITT results show that blood glucose at 30 min after injecting insulin and the area under the curve drop were reduced in the kaempferol group, and so was the insulin resistance index in the kaempferol group. In addition, the mRNA expressions of PI3K, AKT and GLUT4 in the kaempferol group increased significantly, while the protein levels of AKT and GLUT4 were up-regulated by kaempferol administration. It was concluded that kaempferol can significantly regulate the blood glucose, body weight and insulin resistance in mice through activating the PI3K-AKT-GLUT4 signaling.

Keywords: Kaempferol, type 2 diabetes, PI3K-AKT-GLUT4 signaling

(责任编辑:马雅静, 责任译审:朱黎婷)