

三七总皂苷调控 c-Jun 氨基末端激酶改善大鼠肝组织胰岛素抵抗的作用

李若楠¹⁾, 桂莉¹⁾, 李树德²⁾, 郭家智³⁾, 马云兵⁴⁾

(1) 云南省第三人民医院内分泌科, 云南昆明 650011; 2) 昆明医学院生物化学教研室, 云南昆明 650031; 3) 云南省第三人民医院骨科, 云南昆明 650011; 4) 昆明医学院人体解剖学教研室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 构建高脂高胆固醇饮食诱导胰岛素抵抗 SD 大鼠模型, 探讨三七总皂苷改善胰岛素抵抗的作用及其机制. **方法** Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 60 只, 随机分为对照组、模型组和治疗组. 对照组喂以普通饮食, 模型组和治疗组以高脂高胆固醇灌胃加普通饮食喂养 16 周诱发胰岛素抵抗 (IR) 后, 治疗组给予三七总皂苷治疗 8 周, 2 组大鼠继续高脂高胆固醇灌胃直到 24 周取材. 用化学比色法检测 3 组大鼠肝组织氧化应激相关酶和产物: 谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、丙二醛 (MDA) 和总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活力; Western blotting 检测 3 组大鼠肝组织中丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 家族的 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 活性变化. **结果** 模型组体重、Lee's 指数、甘油三酯、总胆固醇、游离脂肪酸、血胰岛素和胰岛素抵抗指数明显高于对照组 ($P < 0.05$); 内源性巯醇抗氧化剂 (酶) GSH 和 GR 含量减少, MDA 的含量明显升高, JNK 激酶磷酸化增高; 三七总皂苷治疗 8 周后大鼠高脂血症和胰岛素抵抗明显改善; 抑制 JNK 激酶磷酸化. 但空腹血糖在 3 组间没有差异 ($P > 0.05$). **结论** 三七总皂苷能减轻胰岛素抵抗模型大鼠高脂血症, 上调大鼠肝组织中内源性巯醇抗氧化剂 (酶) GSH 和 GR 含量, 抑制应激蛋白激酶 JNK 活性, 改善大鼠肝组织胰岛素抵抗.

[关键词] 三七总皂苷; 胰岛素抵抗; 氧化应激; c-Jun 氨基末端激酶; 免疫印迹法

[中图分类号] R591.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 04 - 0008 - 05

Panax Notoginseng Saponin Regulates c-Jun N-terminal Kinase to Improve Insulin Resistance of Rat Liver Tissue

LI Ruo-nan¹⁾, GUI Li¹⁾, LI Shu-de²⁾, GUO Jia-zhi³⁾, MA Yun-bing⁴⁾

(1) Dept. of Diabetes, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011; 2) Dept. of Biochemistry, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 3) Dept. of Anatomy, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 4) Dept. of Osteology, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect and mechanism of Panax Notoginseng Saponin (PNS) in attenuating insulin-resistance by exploiting insulin-resistant SD rats induced by high-fat and high-cholesterol diet. **Methods** 60 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into three groups: control group (20 rats), model group (20 rats) and treatment group (20 rats). The rats in control group were fed with normal diet. By contrast, the rats in model group and the treatment group (20 rats) were intragastrically administrated with high fat and high cholesterol besides normal diet for 16 weeks to induce insulin resistance. The rats in treatment group were further intragastrically administrated with TPNS for 8 weeks. The rats in the two groups were intragastrically

[基金项目] 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2010CD075); 云南省科技厅 - 昆明医学院联合专项基金资助项目 (2009CD213); 云南省教育厅科研基金资助项目 (2010C148)

[作者简介] 李若楠 (1976~), 女, 云南石屏县人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事糖尿病的临床和基础研究工作.

[通讯作者] 马云兵. E-mail: myb292@126.com; 郭家智. E-mail: gjzkm602@163.com

administrated with high fat and high cholesterol until 24 weeks. MDA, GSH, GR and T-SOD in liver tissues were measured by chemical colorimetric analysis. And the c-Jun N-terminal kinase were determined by Western blotting. **Results** Triglyceride, total cholesterol, free fatty acid, insulin and insulin resistance index (IRI) of rats in the model group were significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). The MDA of rats in model group was significant higher than in the control group ($P < 0.05$); the activities of GSH and GR of rats in model group were significantly lower than in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.05$) in T-SOD among three groups. JNK phosphorylation increased in liver tissue of insulin-resistant model rats. After treatment of TPNS, hyperlipidemia and insulin resistance in rats in the treatment group were significantly attenuated ($P < 0.05$). PNS treatment reversed the process of phosphorylation of the above proteins. **Conclusions** PNS can attenuate hyperlipidemia of rats with insulin resistance and by increasing endogenous thiol antioxidant (enzyme) GSH, GR, level to protect liver tissue. At molecular level, PNS can attenuate insulin resistance by decreasing the activities of JNK in the insulin signaling pathway.

[**Key words**] Panax notoginseng saponin; Insulin resistance; Oxidative stress; Protein kinase B/Akt; Western blotting

大量的流行病学资料提示, 长期高脂饮食人群的胰岛素抵抗、肥胖和 2 型糖尿病发病率明显增高^[1]. 研究表明, 高脂可以抑制胰岛素信号转导通路, 导致胰岛素抵抗. 高脂环境诱导氧化应激产生^[2], 并激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 家族 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase) 影响胰岛素受体底物的活性, 抑制胰岛素信号转导途径活性, 促进胰岛素抵抗形成和糖尿病恶化^[3]. 三七总皂苷 (total saponins of Panax notoginseng, PNS) 是五加科人参属植物三七的主要有效活性成分, 含有多种单体皂苷. 具有降血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用^[4]. 查阅大量文献后发现, 三七总皂苷有抗氧化、降血脂和改善胰岛抵抗作用, 但其抗胰岛素抵抗作用机制未见系统研究, 本研究拟通过高脂高胆固醇饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠动物模型^[4,5], 运用比色法对模型大鼠肝组织氧化应激水平作系统检测; 应用 Western blotting 方法检测 MAPKs 家族中 JNK 的活性变化, 探讨三七总皂苷在改善胰岛素抵抗中的作用及其分子机制.

1 资料与方法

1.1 主要试剂

STZ 由美国 Sigma 公司提供. 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 和总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutases, T-SOD) 试剂盒为南京建城生物试剂公司生产.

1.2 实验动物和造模方法

清洁级 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 60 只, 6 周龄, 体重 (210 ± 10) g, 购自昆明医学院实验动物中心, 动物生产许可证号: SCKK (滇) 2005-0008, 室温 (21 ± 2.5) °C, 自然光照, 自由进水进食, 随机分为正常对照组、模型组和治疗组. 正常对照组喂以普通饮食, 模型组和治疗组以高脂高胆固醇灌胃诱发胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR): 高脂高胆固醇灌胃乳剂配制 (脂肪 98%, 胆固醇 2%); 以高脂高胆固醇灌胃 (1 次/d, 5 mL/次). 灌胃 3 个月后, 检测游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TCHOL)、血糖 (GLU) 和血胰岛素 (insulin, INS). 治疗组给予三七总皂苷 (200 mg/kg) 治疗, 治疗 8 周. 模型组和治疗组大鼠给予高脂灌胃 8 周, 取材. 检测血浆 FFA、TG、TCHOL、GLU、INS 和肝组织中 MDA、GSH、GR 和 T-SOD 的含量.

1.3 内眦静脉取血及生化分析方法

血标本采集时间通常在上午 10 点钟以后, 3.6% 水合氯醛麻醉下 (1 mL/100 g) 眼内眦静脉取血, GLU 于 3 h 内检测, 而 FFA、TG、TCHOL 和 INS 在 2 h 内先于 2 000 r/min 离心 10 min 取出血清, 置于 -40 °C 冰箱中保存后自动生化仪上进行检测.

1.4 胰岛素抵抗

按 HOMA 模型计算胰岛素抵抗指数 Insulin Resistance Index (IRI): $HOMA-IRI = FINS \times FBG/22.5$, 以此反映研究对象的胰岛素抵抗程度. 按照 Lee's 指数评价大鼠肥胖程度, 计算公式:

$$Lee's = \frac{\sqrt[3]{\text{体重}(g)} \times 10^3}{\text{体长}(cm)}$$

1.5 肝组织 ROS 与抗氧化物 (酶) 测定

将大鼠麻醉, 快速断头, 取出肝组织, 称重, 用生理盐水制成 10% 的组织匀浆, 离心, 取上清液用相关试剂盒测定 SOD、GR、GSH 和 MDA. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量 (严格按照测定试剂盒测定试剂盒说明书上提供比色法测定).

1.6 大鼠肝组织 c-Jun 氨基末端激酶的磷酸化水平检测

各实验组的大鼠肝组织进行蛋白质样品的制备: 按 10 mL/g 的比例加入组织裂解液, 匀浆, 用 BCA 法进行蛋白定量. 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 上样 - 电泳 - 转膜; 杂交: 封闭 2 h, 漂洗, 然后室温下与一抗 β -actin、jnk 和 p38-jnk, 1:1 000 杂交反应 2 h, 漂洗. 再与羊抗兔 / 羊抗鼠二抗 (1:2 000) 杂交反应 1 h; 漂洗. 化学发光试剂室温下反应 1 min, 暗室曝光 3 min、显影和定影. 扫描条带, 并用图像分析系统进行分析.

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS 软件进行统计分析, 计量资料数据经正态检验均为正态分布 ($P > 0.05$), 经方差齐性检验方差齐 ($P > 0.05$), 采用单因素方差分析, 用 LSD、 q 检验, 进行组间两两比较.

2 结果

2.1 胰岛素抵抗模型大鼠变化

体重变化: 模型组及治疗组体重增长速度较对照组快, 16 周时模型组、治疗组体重明显大于对照组 (见图 1, $P < 0.05$). 24 周时治疗组体重明显小于模型组 (见图 1, $P < 0.05$).

2.2 三七总皂苷治疗前胰岛素抵抗模型大鼠脂代谢及相关生化指标的变化

16 周时模型组及治疗组的 Lee's 指数、FFA、TG、TCHOL、INS 和 IRI 明显高于对照组 ($P < 0.05$); 但身长和空腹血糖在 3 组间没有差异 (见表 1、表 2, $P > 0.05$).

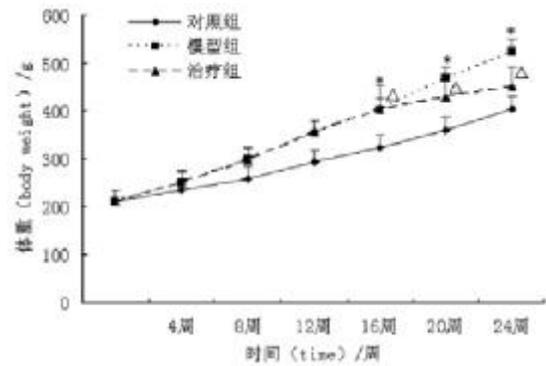


图 1 3 组大鼠 24 周体重的变化
Fig. 1 The changes of body weight of rats in three groups in 24 weeks
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$.

表 1 三七总皂苷治疗前大鼠身长、Lee's 指数、FFA、TG 和 TCHOL 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of body weight, body length, Lee's index, FFA, TG, TCHOL and CRP of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	身长 (cm)	Lee's 指数	FFA ($\mu\text{mol/L}$)	TG (mmo l/L)	TCHO (mmo l/L)
对照组	20	22.9 \pm 2.9	301.8 \pm 28.5	0.27 \pm 0.03	0.63 \pm 0.17	1.44 \pm 0.14
模型组	20	23.1 \pm 3.1	314.3 \pm 20.6*	0.48 \pm 0.05*	0.95 \pm 0.16*	1.94 \pm 0.21*
治疗组	20	23.2 \pm 2.8	313.2 \pm 21.3*	0.47 \pm 0.05*	0.93 \pm 0.15*	1.89 \pm 0.18*

与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 三七总皂苷治疗前大鼠空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数 (IRI) 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The changes of FPG, INS and IRI of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	空腹		
		FPG (mmo l/L)	INS ($\mu\text{IU/mL}$)	IRI
对照组	20	5.67 \pm 1.31	3.54 \pm 1.31	0.89 \pm 0.12
模型组	20	5.72 \pm 1.71	7.73 \pm 1.52*	1.98 \pm 0.23*
治疗组	20	5.68 \pm 1.57	7.27 \pm 1.41*	2.01 \pm 0.17*

与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 三七总皂苷治疗后胰岛素抵抗模型大鼠脂代谢及相关生化指标的变化

模型组及治疗组的 Lee's 指数、FFA、CHO、INS 和 IRI 明显高于对照组 (见表 3、表 4, $P < 0.05$); 三七总皂苷治疗后上述指标明显低于模型组 (见表 3、表 4, $P < 0.05$); 但身长和空腹血糖在三组间没有差异 ($P > 0.05$), 见表 3、表 4。

2.4 三七总皂苷对大鼠肝组织中 ROS 和内生性巯醇抗氧化物 (酶) 的调控作用

胰岛素抵抗模型组大鼠肝组织中 MDA 的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$); GSH 和 GR 较对照组显著降低 ($P < 0.05$), 三七总皂苷治疗后反转上述变化 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.5 三七总皂苷对大鼠肝组织中胰岛素信号转导相关信号通路的调控作用

胰岛素抵抗大鼠肝组织中 JNK 的磷酸化水平上调 (见图 2, $P < 0.05$), 经三七总皂苷治疗 8 周后抑制 JNK 的磷酸化 (见图 2)。

表 3 三七总皂苷治疗后大鼠身长、Lee's 指数、FFA、TG 和 TCHO 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The changes of body weight, body length, Lee's, FFA, TG and TCHO of rats in different ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	身长 (cm)	Lee's 指数	FFA ($\mu\text{mol/L}$)	TG (mmol/L)	TCHOL (mmol/L)
对照组	20	28.9 \pm 2.9	257.8 \pm 28.5	0.28 \pm 0.03	0.63 \pm 0.17	1.64 \pm 0.14
模型组	20	29.0 \pm 3.1	281.3 \pm 20.6*	0.68 \pm 0.05*	1.75 \pm 0.26*	2.94 \pm 0.31*
治疗组	20	28.9 \pm 3.1	265.8 \pm 28.5 $^{\Delta}$	0.39 \pm 0.07 $^{\Delta}$	0.89 \pm 0.24 $^{\Delta}$	1.76 \pm 0.38 $^{\Delta}$

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

表 4 三七总皂苷治疗后大鼠空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The changes of FPG, INS and IRI of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	空腹		
		FPG (mmol/L)	INS ($\mu\text{IU/mL}$)	IRI
对照组	20	5.70 \pm 1.31	3.74 \pm 1.31	0.94 \pm 0.12
模型组	20	5.76 \pm 1.71	8.73 \pm 1.52*	2.23 \pm 0.21*
治疗组	20	5.69 \pm 2.73	5.88 \pm 1.83 $^{\Delta}$	1.48 \pm 0.23 $^{\Delta}$

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

表 5 大鼠肝组织中 GSH、GR、MDA 和 T-SOD 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 The changes of MDA and CAT activity in the liver of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH (mg/gprot)	GR (U/gprot)	MDA (nmol/mgprot)	T-SOD (U/mgprot)
对照组	18	844.75 \pm 64.32	84.08 \pm 8.66	16.37 \pm 6.46	582.16 \pm 9.51
模型组	18	535.82 \pm 80.65*	52.17 \pm 16.41*	32.67 \pm 9.56*	578.22 \pm 22.70
治疗组	18	745.82 \pm 72.70 $^{\Delta}$	80.11 \pm 9.65	23.37 \pm 7.40	566.28 \pm 25.44

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

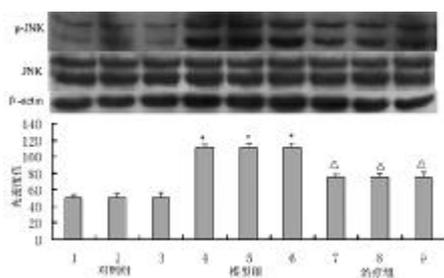


图 2 3 组大鼠肝组织中 JNK 的变化

Fig. 2 The western blotting for JNK of rats in different groups

1~3:对照组; 4~6:模型组; 7~9:治疗组; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

3 讨论

三七为五加科 (Araliaceae) 植物三七 (Panax notoginseng (Burk.) FH.Chen) 的干燥根, 又名田七, 以云南文山出产的三七品质优而闻名全国。其活性成分三七总皂苷具有抑制细胞质过氧化反应、清除自由基的能力和降血脂作用^[6]。本实验中发现三七总皂苷治疗高脂高胆固醇诱导的胰岛素抵抗 SD 大鼠 8 周后, 体重和 Lee's 指数明显低于模型组, FFA、TG、TCHO、INS 和 IRI 明显低于模型组, 而 FPG 没有显著变化 (见表 3、表

4), 故三七总皂苷具有明显的降脂和改善胰岛素抵抗作用, 与文献报道一致, 其作用机制有待深入研究. 越来越多的研究证明: 活性氧族 (Reactive oxygen species, ROS) 直接参与了 2 型糖尿病、高血压、冠心病、老年痴呆和骨质疏松等多种老年相关性疾病的病理过程^[7,8]. 生物体内存在一个有效抵抗 ROS 的抗氧化剂 (Antioxidants) 防御系统. 包括 GSH、GR GPx 和 SOD 等. GSH 可清除体内的超氧离子及其他自由基, 防止肝细胞损伤. GR 可使氧化型 GSH 还原. ROS 损伤细胞膜后, 脂质过氧化物 MDA 生成增加. 本研究发现模型大鼠肝组织中 MDA 的含量明显高于对照组, GR 和 GSH 明显低于对照组 (见表 5). 肝组织出现明显氧化应激状态. 经三七总皂苷治疗后 GR 和 GSH 含量上升, 说明三七总皂苷能上调内源性硫醇抗氧化物酶的含量, 对抗高脂血症和游离脂肪酸诱导的氧化应激效应 (见表 5).

大量研究证实, 游离脂肪酸升高和氧化应激在胰岛素抵抗中扮演了重要的角色, 其机制为 FFA 和各类炎症因子如 TNF- α 诱导了 JNK 的激活, 提高了 IRS-1 上丝氨酸磷酸化水平, 从而减弱了胰岛素靶组织如肝脏和脂肪中胰岛素信号通路的作用^[9,10]. 本实验中胰岛素抵抗大鼠肝组织中 JNK 活性明显增高与文献报道一致 (见图 2). 三七总皂苷治疗后 JNK 的磷酸化水平降低. 可能与三七总皂苷通过调控该信号通路改善胰岛素抵抗大鼠肝组织胰岛素抵抗有关.

综上所述, 三七总皂苷能减轻胰岛素抵抗模型大鼠高脂血症和减少游离脂肪酸生成, 上调大鼠肝组织中内源性硫醇抗氧化物 (酶) GSH、GR 和 GPX 含量以对抗高脂高胆固醇诱导的氧化应激、抑制应激蛋白激酶 JNK 活性, 改善大鼠肝组织胰岛素抵抗.

[参考文献]

- [1] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2006, 444(7 121): 860 - 867.
- [2] WELLEN K E, HOTAMISLIGIL G S. Inflammation, stress, and diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1 111 - 1 119.
- [3] SHEN C, CHEN Y, LIU H, et al. Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(25): 17 721 - 17 730.
- [4] 赵兴国, 陈海峰. 三七总皂苷对大鼠非酒精性脂肪肝模型胰岛素抵抗及瘦素受体表达的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 25(6): 235 - 245.
- [5] 张蕾, 戴敏, 陈礼明. 高脂高胆固醇诱导脂肪肝胰岛素抵抗大鼠模型的建立 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(6): 825 - 828.
- [6] 王红丽, 吴铁, 吴志华. 人参皂甙抗皮肤衰老作用实验研究 [J]. *广东药学院学报*, 2003, 19(1): 25 - 30.
- [7] CYCLACEL LTD, JAMES LINDSAY PLACE, DUNDEE. Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signaling [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10(3): 413 - 428.
- [8] GAO Z, ZHANG X, ZUBERI A, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(8): 20 - 24.
- [9] MANNING A M, DAVIS R J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(7): 554 - 565.
- [10] WHITMARSH A J, CAVANAGH J, TOURNIER C, et al. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation [J]. *Science*, 1998, 281(5 383): 1 671 - 1 674.

(2012 - 02 - 12 收稿)