

# 大黄素对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织 $11\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 1 表达的影响

孙红爽<sup>1</sup>, 乜春城<sup>2</sup>, 朱小丽<sup>1</sup>, 马红芳<sup>1</sup>, 陈赫军<sup>1</sup>, 种宝贵<sup>1</sup>

(1. 哈励逊国际和平医院药学部, 衡水 053000; 2. 哈励逊国际和平医院生殖医学科, 衡水 053000)

**摘要:** 观察大黄素对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织  $11\beta$ -HSDI 表达的影响, 探讨其改善胰岛素抵抗的可能机制。采用 30 只雄性 Wistar 大鼠作为研究对象, 随机分为对照组、模型组和给药组, 每组 10 只。模型建立通过高脂饲料喂养结合地塞米松刺激的方式。12 周后造模成功, 给药组予大黄素  $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃。给药 4 周后, 进行胰岛素耐量试验, 检测血糖、血脂、血液胰岛素及皮质酮水平, 计算肝指数、内脏肥胖指数及 HOMA-IR 指数和  $11\beta$ -HSDI 基因及蛋白表达情况。结果表明, 与模型组比较, 给药组胰岛素抵抗状态显著改善, 血糖、胰岛素及血脂水平明显降低, 肝指数及内脏肥胖指数也明显下降, 同时内脏脂肪组织  $11\beta$ -HSDI 基因及蛋白表达明显下调。可见大黄素可显著改善胰岛素抵抗大鼠的糖脂代谢及胰岛素敏感性, 其作用机制可能与抑制  $11\beta$ -HSDI 基因及蛋白表达有关。

**关键词:** 大黄素; 胰岛素抵抗;  $11\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 1; 大鼠

中图分类号: S865.127

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)03-0427-04

## Effect of emodin on the expression of $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue of insulin resistance rats

SUN Hongshuang<sup>1</sup>, NIE Chuncheng<sup>2</sup>, ZHU Xiaoli<sup>1</sup>, MA Hongfang<sup>1</sup>, CHEN Hejun<sup>1</sup>, CHONG Baogui<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000;

2. Department of Reproductive Medicine, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000)

**Abstract:** To observe the effect of emodin on the expression of  $11\beta$ -HSDI in adipose tissue of insulin resistance rats and investigate the possible mechanism, 30 male Wistar rats were randomly divided into three groups: the control, model group and treatment group ( $n=10$ ). The model was established by high fat diet feeding and dexamethasone stimulation. After 12 weeks, the treatment group was given emodin  $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  by intragastric administration. After 4 weeks, insulin tolerance test was performed. Blood sugar, lipid, insulin and corticosterone level were measured. Liver index, visceral obesity index and HOMA-IR index were computed. The  $11\beta$ -HSDI gene and protein expression were measured. As results, compared to the model group, the insulin resistance was significantly improved in the treatment group, while blood glucose, insulin, lipid level, liver index and visceral obesity index were significantly decreased. Meanwhile, the expression of  $11\beta$ -HSDI and protein in visceral adipose tissues was significantly decreased. In conclusion, emodin can significantly improve the insulin resistance in rats, which maybe related to the inhibition of the  $11\beta$ -HSDI gene and protein expression.

**Key words:** emodin; insulin resistance;  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; rats

大黄素属游离型蒽醌衍生物, 化学名为 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽酮, 是中药大黄的主要有效单体成分, 存在于大黄、虎杖、决明子、何首乌和芦荟等含蒽醌类成分的中药中。近年来, 国内外大量研究

表明大黄素除具有抗炎、抗氧化、保护肝肾、免疫调节与抗肿瘤等作用外, 还可改善胰岛素抵抗状态, 用于糖尿病的治疗<sup>[1]</sup>。 $11\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 1 ( $11\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1,  $11\beta$ -HSDI)

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 哈励逊国际和平医院研究生科研基金 (2014-06) 和河北省 2015 年度医学科学研究课题 (20150432) 共同资助。

作者简介: 孙红爽, 主管药师。E-mail: hyshs1239@163.com

\* 通信作者: 种宝贵, 主任药师。E-mail: cbg0820@163.com

在体内可提高糖皮质激素浓度,与胰岛素抵抗及其并发症密切相关<sup>[2]</sup>。本研究通过观察大黄素对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织  $11\beta$ -HSD1 表达的影响,探讨其改善胰岛素抵抗的可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 动物** 雄性 Wistar 大鼠 30 只,由河南实验动物中心提供,体重 180~220 g,清洁级,生产许可证号:SCXK(豫)2005-0001,动物批号:410116。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 大黄素(陕西森弗生物技术有限公司,20111120006);地塞米松注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:0908012,规格:1 mL:5 mg×10 盒);两步法 RT-PCR 试剂盒(Takara 公司); $11\beta$ -HSD1 抗体(Santa Cruz 公司);实时定量 PCR 仪(美国 MJ Research 公司);Western blotting 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 动物分组** 动物单笼饲养在恒温(23±2)℃、恒湿(60%±5%)环境中,明暗周期 12 h,自由取食饮水。适应性喂养 1 周后,随机分为对照组 10 只、造模组 20 只。对照组喂以普通饲料,造模组喂以自制高脂饲料,高脂饲料(配方为:25%猪油,5%糖,2%胆固醇,2%食盐,66%基础饲料)。8 周后造模组再辅以地塞米松刺激(每天 8:00 及 20:00 皮下注射地塞米松 0.10 mg·kg<sup>-1</sup>)。12 周后检测空腹血糖值(FBG)及随机血糖值(RBG),以 FBG≥7.8 mmol·L<sup>-1</sup> 和 RBG≥16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 为 2 型糖尿病大鼠成模标准。造模组 20 只大鼠全部模型建立成功。

**1.2.2 动物给药** 确定胰岛素抵抗大鼠模型已成功建立后,造模组再随机分为模型组和给药组,每组 10 只。给药组灌胃 200 mg·kg<sup>-1</sup> 大黄素混悬液(用 0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制),模型组和对照组灌胃等量的 0.5%羧甲基纤维素钠溶液。每日 1 次,连续 4 周后进行相关指标测量。

**1.2.3 试验指标的检测** (1)胰岛素耐量试验。16 周后,进行胰岛素耐量试验,试验方法参照文献<sup>[3]</sup>。

(2) 2 肝指数及内脏肥胖指数的测定。大鼠称重,20%乌拉坦(0.5 mL/100 g)腹腔注射,麻醉。颈动脉插管取血,血样 3500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 获得血清,于-20℃保存,待测。开腹腔取出肝脏及内脏脂肪(辜丸脂肪垫+双侧肾周脂肪+反折腹膜处的脂肪),分别计算肝指数(HI)及内脏肥胖指数(VOI)。

$$HI = \frac{\text{肝脏重量}}{\text{体重}} \times 1000$$

$$VOI = \frac{\text{内脏脂肪重量}}{\text{体重}} \times 1000$$

(3) 血液学指标的测定。应用比色法检测血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白-胆固醇及游离脂肪酸;应用放射免疫分析法检测血清胰岛素及皮质酮,并计算稳态胰岛素评估模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR):

$$HOMA-IR = \frac{\text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖}}{22.5}$$

(4) 内脏脂肪组织  $11\beta$ -HSD1 基因表达。每组取 3 只动物冻存脂肪组织各 100 mg,于磷酸盐缓冲液(PBS)中漂洗,除去淤血,迅速置于-80℃冻存,用于  $11\beta$ -HSD1 mRNA 表达量的检测。 $11\beta$ -HSD1 引物上游 5'-GCAGAGCGATTTGTTGTT-3',引物下游 5'-TGTCTATGAAGCCGAGGA-3'; $\beta$ -actin 上游 5'-CATCCATGGCAATGAGCGG-3',下游 5'-TGCGGTCCACGATGGAGGGGCC-3'。PCR 反应条件为 94℃预变性 30 s,然后 94℃变性 4 min,48℃退火 1.5 min,72℃延伸 2 min,运行 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶电泳,结束后于全自动凝胶成像分析系统进行灰度扫描,并计算各组相对灰度,以排除各组上样误差。计算公式如下:

$$\text{相对灰度} = \frac{\text{各组泳道灰度}}{\text{对应泳道内参灰度}}$$

(5) 内脏脂肪组织  $11\beta$ -HSD1 蛋白表达。每组取 3 只动物的冻存脂肪组织,提取组织蛋白进行 Western blotting 检测。14.7%分离胶、5%浓缩胶,60V 电泳后转膜 2 h,室温封闭 2 h,以免抗小鼠  $11\beta$ -HSD1 多克隆抗体为一抗(1:200 稀释)4℃过夜,以羊抗兔 IgG-HRP 抗体为二抗(1:800 稀释)室温作用 2 h,ECL 检测。实验所得条带,在 Bandscan 分析软件中测得各自的总灰度值,进行定量分析,并用自身  $\beta$ -actin 灰度值校正。

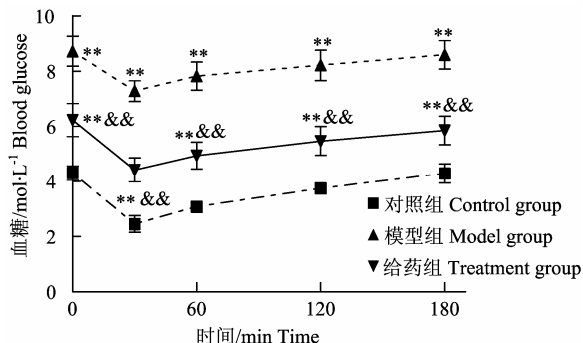
**1.2.4 统计学处理** 结果以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学处理采用 SPSS 14.0 统计学软件包。用  $t$  检验比较组间差异的显著性,多重组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)及 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 胰岛素耐量试验

胰岛素耐量异常是反映大鼠全身性 IR 的关键指标,结果见图 1。模型组基础血糖(0 min 时血糖值)与对照组比较显著性升高( $P=0.000$ );给药组

基础血糖与模型组比较显著降低 ( $P=0.000$ ), 但仍高于对照组 ( $P=0.000$ )。腹腔注射胰岛素 30 min 后, 与基础血糖值相比, 对照组、模型组和给药组分别下降了 44.02%、16.51% 和 29.05%。结果显示, 模型组出现明显的胰岛素抵抗, 给药组胰岛素抵抗状态明显改善。



\*\* :  $P < 0.01$ , 与对照组比较; && :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

下同

\*\* :  $P < 0.01$ , VS the control group; && :  $P < 0.01$ , VS the model group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ). The same below

图 1 各组 Wistar 大鼠的胰岛素耐量试验情况

Figure 1 The results of insulin tolerance test in Wistar rats

## 2.2 肝指数及内脏肥胖指数

与对照组比较, 模型组肝指数及内脏肥胖指数均明显增大 ( $P=0.000$ ); 与模型组比较, 给药组肝指数及内脏肥胖指数均明显下降 ( $P=0.013$  或  $P=0.000$ ), 结果见图 2。

## 2.3 血液生化指标

HOMA-IR 指数及血液生化指标检测结果见表

表 1 Wistar 大鼠的血液生化指标情况

Table 1 The serum parameters of Wistar rats

血液参数 Blood parameter	对照组 CK	模型组 Model group	给药组 Treatment group
血糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Blood sugar	4.30±0.26	8.72±0.54**	6.23±0.60**&&
胰岛素/ $\mu\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ Insulin	14.30±1.38	37.93±3.58**	20.35±2.52**&&
HOMA-IR	2.74±0.20	14.86±1.69**	5.67±0.88**&&
皮质酮/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Corticosterone	6.02±0.95	16.96±0.66**	11.94±1.41**&&
总胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Total cholesterol	1.14±0.08	2.01±0.18**	1.53±0.16**&&
甘油三酯/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Triglyarde	0.59±0.07	1.19±0.15**	0.91±0.10**&&
低密度脂蛋白胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LOL cholesterol	1.16±0.11	0.65±0.07**	0.77±0.09**
游离脂肪酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA	721.46±52.95	1865.61±152.06**	983.74±62.68**&&

注: \*\* :  $P < 0.01$ , 与对照组比较; && :  $P < 0.01$ , 与模型组比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )。

Note: \*\* :  $P < 0.01$ , VS the control group; && :  $P < 0.01$ , VS the model group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ).

## 3 讨论

近年来, 越来越多的研究证实  $11\beta$ -HSD1 与胰岛素抵抗的发生密切相关, 它是糖皮质激素代谢的

1. 与对照组比较, 模型组血糖、胰岛素、HOMA-IR、皮质酮及血脂水平均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 给药组以上各项指标均明显好转, 除低密度脂蛋白胆固醇外均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

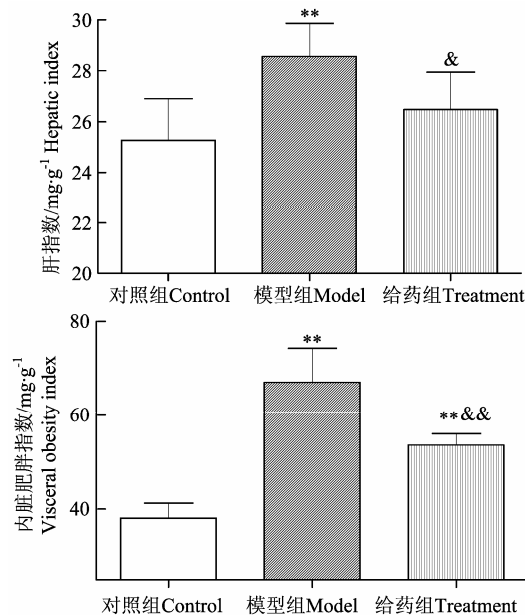


图 2 Wistar 大鼠的肝指数及内脏肥胖指数

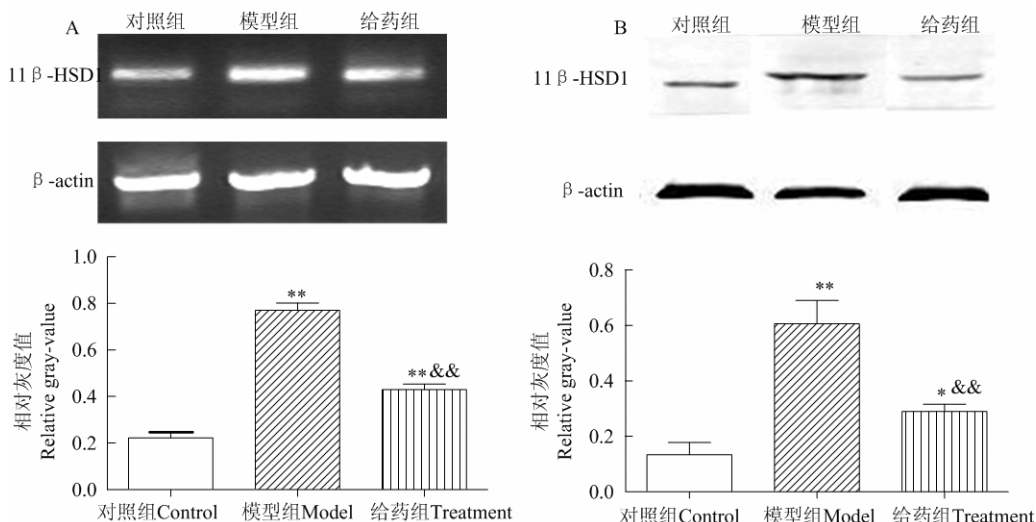
Figure 2 The hepatic index and visceral obesity index in Wistar rats

## 2.4 内脏脂肪组织 $11\beta$ -HSD1 基因及蛋白表达

与对照组比较, 模型组内脏脂肪组织  $11\beta$ -HSD1 mRNA 及蛋白表达明显升高 ( $P=0.000$  或  $P=0.008$ ); 与模型组比较, 给药组内脏脂肪组织  $11\beta$ -HSD1 mRNA 及蛋白表达显著降低 ( $P=0.000$  或  $P=0.005$ ), 但仍高于对照组 ( $P=0.000$  或  $P=0.043$ ), 结果见图 3。

关键酶, 可使无活性的可的松转化为有活性的氢化可的松, 从而发挥其对抗胰岛素的降血糖作用<sup>[4]</sup>。 $11\beta$ -HSD1 可提高糖异生关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖 6-磷酸酶的活性, 加强肝脏糖

异生;还可提高糖原合成酶的活性,增加肝脏糖原的合成;另外,通过抑制丙酮酸的氧化脱羧和葡萄糖转运子-4的活性,降低外周组织对葡萄糖的摄取和利用,从而引发胰岛素抵抗<sup>[5-6]</sup>。除此之外,



A: 内脏脂肪组织 11β-HSD1 mRNA 表达; B: 内脏脂肪组织 11β-HSD1 蛋白表达

A: The expression of 11β-HSD1 mRNA in visceral adipose; B: Western blotting analysis of 11β-HSD1 in visceral adipose

图 3 11β-HSD1 在 Wistar 大鼠内脏脂肪组织中基因及蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 3 The expression of 11β-HSD1 mRNA and protein in visceral adipose of Wistar rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

目前已有研究证实大黄素可有效改善 2 型糖尿病动物的糖脂代谢,调节肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、C 反应蛋白等炎症因子的表达,在治疗糖尿病发面具有潜在作用<sup>[9]</sup>,但具体作用机制尚不清楚。我们的前期研究发现,采用皮下注射地塞米松联合高脂饮食的方式可成功建立大鼠胰岛素抵抗模型,且与以往单纯高脂饲料喂养相比,大鼠的 IR 状态更加明显,而动物死亡率却没有增加<sup>[10]</sup>。本研究再次通过这种方式成功建立胰岛素抵抗大鼠模型,观察大黄素对胰岛素抵抗的治疗作用。结果显示,大黄素可显著提高胰岛素抵抗大鼠的胰岛素敏感性,降低血糖、胰岛素及血脂水平,降低肝指数及内脏肥胖指数。同时,大黄素可抑制内脏脂肪组织 11β-HSD1 的基因及蛋白表达。结果提示,大黄素可能是一种 11β-HSD1 抑制剂,通过抑制靶组织中 11β-HSD1 的表达,进而发挥抑制糖皮质激素的作用,改善糖尿病患者的血糖水平和胰岛素抵抗状态。

### 参考文献:

- [1] 石梅兰,李强翔. 大黄素在糖尿病胰岛素抵抗中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(19): 4351-4353.
- [2] 孙红爽, 卮春城. 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 与胰岛素抵抗及其抑制剂的研究进展[J]. 中国医师杂志, 2015, 17(8): 1275-1277.
- [3] 孙红爽, 郑文卿, 刘雯, 等. 急性或慢性应激对高热量饲料喂养大鼠 HPA 轴的影响[J]. 安徽医药, 2010, 14(1): 17-19.
- [4] 张萍, 李圣贤, 刘伟. 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 与胰岛素抵抗和多囊卵巢综合症[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2012, 32(2): 103-106.
- [5] WINNICK J J, RAMNANAN C J, SARASWATHI V, et al. Effects of 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase-1 inhibition on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 304(7): 747-756.
- [6] ANANDA C, CATON P W, JULIUS K, et al. Elevated hepatic 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 induces insulin resistance in uremia [J]. PNAS, 2014, 111(10): 3817-3822.
- [7] SCHNACKENBERG C G, COSTELL M H, KROSKY D J, et al. Chronic inhibition of 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity decreases hypertension, insulin resistance, and hypertriglyceridemia in metabolic syndrome [J]. Biomed Res Int, 2013, Article ID 427640, 10 pages.
- [8] OKAZAKI S, TAKAHASHI T, IWAMURA T, et al. HIS-388, a Novel Orally Active and Long-Acting 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitor, Ameliorates Insulin Sensitivity and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obesity and Nongenetic Type 2 Diabetic Murine Models [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 351(1): 181-189.
- [9] 周丽嫦, 徐艳燕, 陈伟标, 等. 大黄素改善肥胖型 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的实验研究[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1487-1490.
- [10] 孙红爽, 卮春城, 朱小丽, 等. 11β-HSD1 在糖皮质激素联合高脂喂养大鼠胰岛素抵抗中的作用[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2016, 36(1): 14-17.