

## 天麻素对胰岛素抵抗模型中 CBS 表达的影响

白永<sup>1)</sup>, 范晓明<sup>2)</sup>, 郭家智<sup>2)</sup>, 杨建宇<sup>3)</sup>, 李树德<sup>4)</sup>

(1) 昆明医科大学基础医学院基础医学实验中心; 2) 解剖学与组织胚胎学系; 3) 药理学系; 4) 生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 研究天麻素对胰岛素抵抗动物模型中 CBS 表达的改变, 探讨胰岛素抵抗条件下天麻素调控同型半胱氨酸的机理. **方法** 6 周 SD 大鼠通过高糖高脂饮食加高脂灌胃 3 月制造胰岛素抵抗动物模型. 确定模型建立成功后, 随机分为胰岛素抵抗模型组 (10 只) 和天麻素治疗组 (10 只). 天麻素治疗组给予天麻素腹腔注射 (60 mg/(kg·d). 治疗 1 月后, 各组取空腹血浆测定同型半胱氨酸含量. 利用免疫组化、逆转录 PCR (RT-PCR) 和 Western blot 检测肝脏组织 CBS 的表达. **结果** 天麻素治疗组与胰岛素抵抗模型组相比, 血浆空腹同型半胱氨酸的浓度降低 ( $P < 0.05$ ), CBS 的 mRNA 和蛋白质表达水平上调 ( $P < 0.05$ ). **结论** 天麻素可降低胰岛素抵抗的同型半胱氨酸的含量, 其机理可能是通过增加 CBS 在肝细胞内的表达.

**[关键词]** 天麻素; 胰岛素抵抗; CBS

**[中图分类号]** R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0006 - 04

## Effect of Gastrodin on the Expression of CBS in Insulin Resistance Model

BAI Yong<sup>1)</sup>, FAN Xiao-ming<sup>2)</sup>, GUO Jia-zhi<sup>2)</sup>, YANG Jian-yu<sup>3)</sup>, LI Shu-de<sup>4)</sup>

(1) Center of Basic Medical Experiment; 2) Dept. of Anatomy and Embryology; 3) Dept. of Pharmacology; 4) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the change of expression of cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) in insulin resistance model, so as to discuss the regulation mechanism of gastrodin in insulin resistance. **Methods** The SD rats, six weeks of age, were made the insulin resistance model by High sugar fat diet and High fat gavage for 3 months. When the insulin resistance model was established, the rats were randomly divided into the insulin resistance group ( $n = 10$ ) and the gastrodin treatment group ( $n = 10$ ). The gastrodin treatment group was fed by High fat diet and High fat gavage and intraperitoneal injection of gastrodin for 1 month; the fasting plasma concentration of homocysteine was measured. The expression of cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) in the rat liver tissue were detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western Blot. **Results** Compared with the insulin resistance group, the plasm concentrations of homocysteine were decreased ( $P < 0.05$ ) and the mRNA and protein expression levels of CBS were up-regulated in gastrodin treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gastrodin can reduce the plasm concentration of homocysteine, the regulation mechanism may be up-regulating the expression of CBS in liver cell.

**[Key words]** Gastrodin; Insulin resistance; Cystathionine- $\beta$ -synthase

---

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81360128, 81360252); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2013FZ052); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2009CD213, 2011FB246)

**[作者简介]** 白永 (1980~), 男, 云南永胜县人, 医学学士, 助理实验师, 主要从事解剖学实验技术研究工作. 范晓明与白永对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 李树德. E-mail: shudeli006@vip.sina.com

天麻素 (Gastrodin) 是中药天麻中的一种有效成分之一<sup>[1]</sup>, 对神经细胞具有保护作用, 可发挥镇静安神效果<sup>[2]</sup>. 同时, 天麻素可以增加机体的免疫能力, 发挥抗炎症和抗氧化作用, 保护机体的细胞的完整性<sup>[3,4]</sup>. 胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病的主要诱因, 在胰岛素抵抗的动物模型中, 同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 的含量增加, 调节同型半胱氨酸代谢的亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 和胱硫醚合成酶 (cystathionine- $\beta$ -synthase, CBS) 的表达下调<sup>[5]</sup>. 另外, 在胰岛素抵抗的动物模型中, 采用抗氧化剂白藜芦醇 (resveratrol, RES) 进行干预性治疗发现, MTHFR 和 CBS 的表达是上调, 同型半胱氨酸的含量降低. 但是, 作为抗氧化剂的天麻素是否在胰岛素抵抗模型中也可降低同型半胱氨酸的含量目前不清楚. 本实验通过建立胰岛素抵抗的动物模型, 探讨天麻素干预治疗后同型半胱氨酸的改变及其分子机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6 周雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 180~220 g (由昆明医科大学实验动物部提供). 适应性喂养 2 周后用于实验.

### 1.2 主要试剂

葡萄糖和胰岛素测定试剂盒 (南京建成生物公司), 兔抗鼠多克隆抗体 CBS 和 ECL 发光试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司), 生物素标记的山羊抗兔多克隆抗体 (北京中杉金桥公司). CBS 基因的引物合成 (上海英潍捷基贸易有限公司) RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 逆转录试剂盒 (美国 Fermentas 公司).

### 1.3 方法

**1.3.1 胰岛素抵抗模型的建立** SD 大鼠利用高脂高糖饮食加高脂灌胃, 3 个月后, 在空腹状态下通过尾静脉取血, 测氧化酶法测定血糖浓度, 化学发光法测定空腹血胰岛素的浓度, 按照公式<sup>[6]</sup>:

$$In = \frac{1}{\text{空腹血糖浓度} \times \text{血清胰岛素浓度}}$$

计算胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI). 确定胰岛素抵抗动物模型建立成功.

**1.3.2 实验分组和取材** 采用胰岛素抵抗模型建立成功的 20 只大鼠随机分为胰岛素抵抗对照组和天麻素治疗组. 胰岛素抵抗对照组正常饮食, 天麻素治疗组正常饮食加 60 mg/(kg.d)腹腔注射. 1 个月

后, 在空腹状态下 2 组大鼠分别用戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 从眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 获得血浆. 同时, 取血完成后处死大鼠, 取肝脏组织保存在 -80 °C 备用.

**1.3.3 免疫组化检测 CBS 在肝细胞中的阳性表达** 肝脏组织放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 4 h, 分别不同浓度的 (15% 和 25%) 的蔗糖溶液梯度脱水 24 h, 冰冻切片后 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断, 血清封闭, 分别滴加 1:200 稀释的兔抗鼠多克隆一抗 CBS 的抗体后, 在 4 °C 孵育过夜, 第 2 天滴加生物素标记的二抗 (山羊抗兔) 和辣根酶标记的链霉卵白素工作液, 室温孵育 10 min 后加 DAB 显色, 苏木精复染, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 用 PBS 代替一抗, 做阴性对照, 棕色为阳性着色, 显微镜观察并保存图像, 各随机选取 5 个 400 倍的显微镜视野, 用 MiPrd 免疫组化分析软件分析平均灰度值.

**1.3.4 RT-PCR 检测 CBS 的 mRNA 表达水平** 用 mRNA 提取试剂盒提取肝脏组织总 RNA, 确定总 RNA 的完整性和纯度. 样本定量后各取 1  $\mu$ g 用于逆转录 cDNA, 然后以 1  $\mu$ L 的 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应扩增 CBS 目的片段. CBS 的上游引物序列为: 5'-AGTCTGGATCTCGCCTGATAC-3', 下游引物序列为: 5'-TGGTGGATAGGTGGTTCAA-G-3', 扩增长度为 412 bp. PCR 扩增反应条件如下: 98 °C 预变性 3 min, 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 35 s, 循环 30 次, 再延伸 5 min. PCR 反应产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 45 min, 电压 90 V, 电泳完成后用凝胶成像仪拍照采集图像, Image J (q1.42) 软件计算各条带的荧光强度值, 以 GAPDH 作为内参. 每组实验至少重复 3 次.

**1.3.5 Western Blot 检测 CBS 的 d 蛋白质表达水平** 根据组织裂解液说明书指导, 采用 100 mg 肝脏组织: 1 mL 组织裂解液, 制备肝脏组织匀浆液, BCA 法测定匀浆液的蛋白质含量, 取各样本 50  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h 后分别加入 1:1 000 稀释的兔抗鼠多克隆一抗 CBS. 4 °C 孵育过夜, 第 2 天洗膜后加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 (山羊抗兔) 孵育 2 h, 洗膜后与 ECL 化学发光试剂反应, 曝光洗片, 扫描条带后用 Image J (q1.42) 软件计算各条带的灰度值, 以  $\beta$ -actin 作为内参. 每组实验至少重复 3 次.

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件分析, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用独立样本配对 *t* 检

验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胰岛素抵抗模型的建立

大鼠通过高脂高糖饮食加高脂灌胃 3 个月后, 与正常饮食的比较, 空腹血糖上升 ( $15.17 \pm 2.42$ ) mmol/L, 胰岛素增加 ( $3.84 \pm 1.23$ ) mIU/L, 胰岛素敏感指数降低 ( $-4.06$ ), 确定胰岛素抵抗的动物模型建立成功。

### 2.2 空腹血浆同型半胱氨酸的改变

天麻素治疗组与胰岛素抵抗组相比, 天麻素干预治疗后, 血浆同型半胱氨酸的含量降低 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 天麻素可能通过发挥抗氧化作用, 降低同型半胱氨酸的含量 (图 1)。

### 2.3 CBS 在肝细胞中的阳性表达的改变

免疫组织化学检测发现, CBS 在胰岛素抵抗组和天麻素治疗组的肝细胞胞浆中均有表达, 天麻素治疗后 CBS 的棕色颗粒增多, 平均灰度值降低 ( $P < 0.05$ )。该结果说明, CBS 在肝细胞中的表达活跃, 天麻素的处理会增加在肝细胞内表达的量。(图 2、表 1)。

### 2.4 肝脏组织中 CBS 的 mRNA 表达的改变

RT-PCR 结果显示, 天麻素治疗后, CBS 的 mRNA 的表达水平上调, 与胰岛素抵抗组比较, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 天麻素可通过调控 CBS 的转录水平, 降低同型半胱氨酸的含量 (图 3)。

### 2.5 肝脏组织中 CBS 蛋白质表达的改变

Western blot 结果显示, 天麻素治疗后, CBS 蛋白质表达水平增加, 与胰岛素抵抗组比较, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 天麻素可通过调控 CBS 的翻译水平, 最终降低同型半胱氨酸的含量 (图 4)。

## 3 讨论

同型半胱氨酸作为一种蛋氨酸代谢的中间产物, 最早认为是引起动脉粥样硬化的危险因子<sup>[7]</sup>。后来的研究发现, 同型半胱氨酸还与糖尿病、骨质疏松、认知障碍和多囊综合症等多种疾病相关<sup>[8-10]</sup>。在高同型半胱氨酸的动物模型中, 已经发现存在着胰岛素抵抗的现象<sup>[11]</sup>。同时, 在胰岛素抵抗的模型中, 同样存在同型半胱氨酸的含量增加, 其机理可能与调节同型半胱氨酸转化的相关酶的表达下调有关。在转化同型半胱氨酸的酶中, 主要在肝

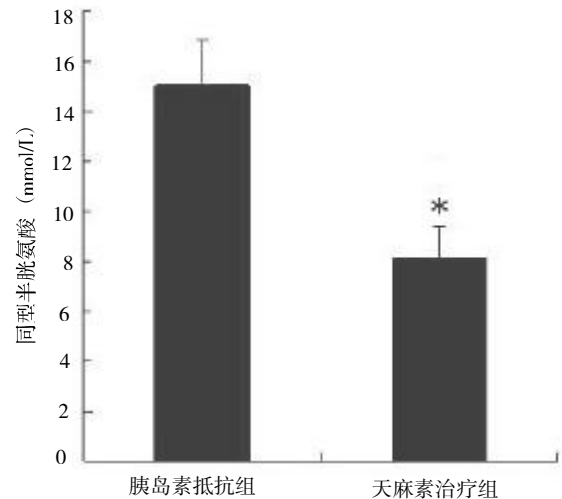


图 1 血浆同型半胱氨酸浓度

Fig. 1 Concentration of the plasma homocysteine with insulin resistance group compared, \* $P < 0.05$ .

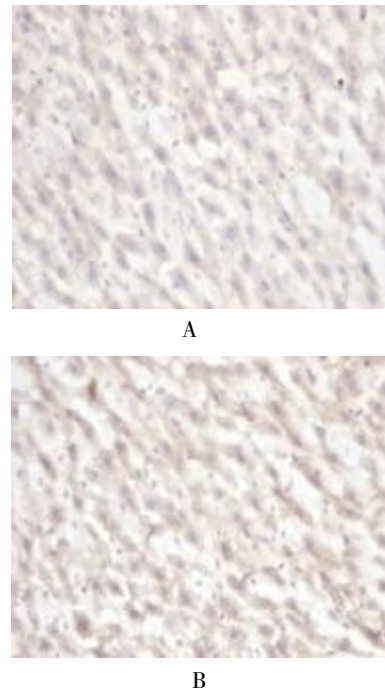


图 2 肝脏组织中 CBS 的表达 ( $\times 200$ )

Fig. 2 The expression of CBS in the liver tissue ( $\times 200$ )

A: 胰岛素抵抗组的肝组织 CBS 免疫组织化学染色;  
B: 天麻素治疗组的肝组织 CBS 免疫组织化学染色。

表 1 CBS 的平均灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of CBS average gray ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CBS
胰岛素抵抗组	141.47 ± 4.15
天麻素治疗组	102.35 ± 5.84*

与胰岛素抵抗组比较, \* $P < 0.05$ .

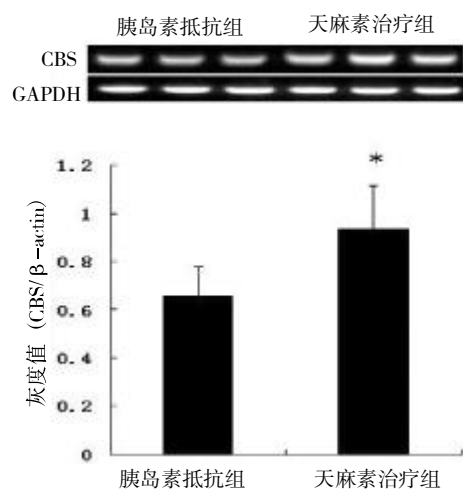


图3 肝脏组织中CBS的mRNA表达

Fig. 3 The mRNA expression of CBS in the liver tissue with insulin resistance group compared, \* $P < 0.05$ .

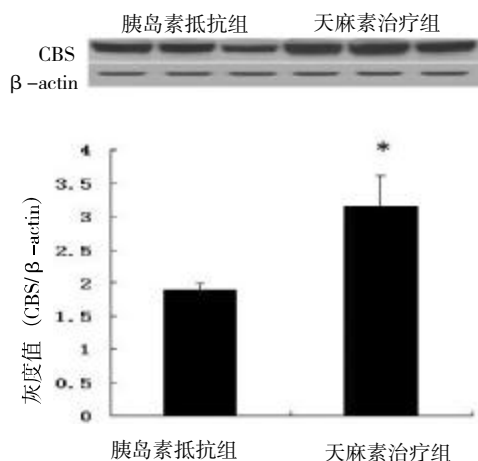


图4 肝脏组织中CBS的蛋白质表达

Fig. 4 The protein expression of CBS in the liver tissue

与胰岛素抵抗组比较, \* $P < 0.05$ .

脏组织中表达亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)、胱硫醚合成酶(CBS)和蛋氨酸合成酶(MTR)是主要的<sup>[12]</sup>。其中CBS的表达在同型半胱氨酸的降低中起到关键作用。所以,抑制胰岛素抵抗条件下CBS的表达,这是降低同型半胱氨酸的一种主要的策略。天麻素是我国传统中药中确定的一种有效成分,临床上已经广泛用于镇静和提高机体的免疫能力。同时,该物质具有抗炎和抗氧化作用<sup>[4]</sup>,对于由于缺血和缺氧所引起的大脑损伤具有一定的保护作用。但在胰岛素抵抗的动物模型中,天麻素是否对前炎性因子同型半胱氨酸的含量具有降低作用,从而抑制由同型半胱氨酸所引起的相关的并发症,目前不清楚。本研究通过建立胰岛素抵抗的动物模型,给予天麻素的干预性治疗,探讨同型半胱

氨酸的改变及机理。实验结果发现,天麻素治疗后,血浆同型半胱氨酸的含量降低,调节同型半胱氨酸代谢的CBS的mRNA和蛋白质水平增加。结果表明,天麻素可以降低胰岛素抵抗模型中同型半胱氨酸的含量,其机理可能是通过调控CBS的表达增加来完成。当然,天麻素也可能调控同型半胱氨酸转化的其它的酶,这有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] YANG X D, ZHOU J, YANG R, et al. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(2):180-186.
- [2] 蒋根灵, 李庆林. 天麻素通过下调ERK1/2-P38信号通路保护谷氨酸损伤的PC12细胞[J]. *安徽中医学院学报*, 2013, 32(3):71-75.
- [3] SHU G, YANG T, WANG C, et al. Gastrodin stimulates anticancer immune response and transplanted H22 hepatic ascitic tumor cell growth: Involvement of NF- $\kappa$ B signaling activation in CD4+ T cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 269(3):270-279.
- [4] YANG P, HAN Y, GUI L, et al. Gastrodin attenuation of the inflammatory response in H9c2 cardiomyocytes involves inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPKs activation via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(8):1124-1133.
- [5] 范晓明, 郭家智, 刘世昌, 等. 胰岛素抵抗大鼠模型中同型半胱氨酸代谢关键酶的变化 [J]. *解剖学报*, 2013, 44(4):530-534.
- [6] 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S, et al. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. *中华内科杂志*, 1993, 32(10):656-660.
- [7] WANG X, CUI L, JOSEPH J, JIANG B, et al. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3):753-760.
- [8] HUANG T, REN J, HUANG J, et al. Association of homocysteine with type 2 diabetes: a meta-analysis implementing Mendelian randomization approach [J]. *BMC Genomics*, 2013, 10(14):867.
- [9] CACCIAPUOTI F. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 36(3):258-262.
- [10] GRODNITSKAYA E E, KURTSEY M A. Homocysteine metabolism in polycystic ovary syndrome [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(3):186-189.
- [11] LI Y, JIANG C, XU G, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4):817-827.
- [12] NIENABER-ROUSSEAU C, ELLIS S M, MOSS S J, et al. Gene-environment and gene-gene interactions of specific MTHFR, MTR and CBS gene variants in relation to homocysteine in black South Africans [J]. *Gene*, 2013, 530(1):113-118.

(2014-02-14 收稿)