

黄连素对肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的干预研究

侯丽琼, 赵铁耘[△], 张伊祎

四川大学华西医院 内分泌代谢科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨黄连素改善肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的可能机制。方法 40只Wistar大鼠分为高脂组(HF组,30只)和正常对照组(NC组,10只)。成模后处理NC组10只及HF组10只大鼠。检测血浆中内毒素(ET)水平,RT-PCR检测骨骼肌中Toll样受体4(TLR4)mRNA,Western blot检测骨骼肌TLR4、I κ B激酶(IKK β)、IKK β 181位丝氨酸磷酸化(p-IKK β ^{Ser181})、核因子 κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白表达,胰岛素受体(IR)与胰岛素受体底物(IRS)-1总蛋白及磷酸化水平。余20只肥胖大鼠分为黄连素干预组(FB组,10只)及肥胖模型对照组(FC组,10只),继续高脂饮食喂养,FB组予200 mg/(kg·d)每日1次黄连素灌胃,FC组予等量蒸馏水灌胃,持续8周后检测以上指标。结果 肥胖大鼠血浆中ET水平升高,且骨骼肌TLR4/IKK β /NF- κ B内毒素信号通路激活,炎症因子TNF- α 蛋白表达增加,黄连素干预使肥胖胰岛素抵抗大鼠血浆中ET水平降低,且骨骼肌组织TLR4/IKK β /NF- κ B内毒素信号通路各蛋白及TNF- α 蛋白表达均下调,IR及IRS-1酪氨酸磷酸化水平平均升高($P<0.05$)。结论 黄连素可改善肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素抵抗,其机制可能是通过下调骨骼肌TLR4/IKK β /NF- κ B内毒素信号通路减少炎症因子TNF- α 产生所致。

【关键词】 黄连素 骨骼肌 胰岛素抵抗 TLR4 IKK β

Effect of Berberine on the Insulin Resistance and TLR4/IKK β /NF- κ B Signaling Pathways in Skeletal Muscle of Obese Rats with Insulin Resistance HOU Li-qiong, ZHAO Tie-yun[△], ZHANG Yi-yi. Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: chuandazhaotieyun@163.com

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism of berberine improve insulin resistance in skeletal muscle of obese rats. **Methods** Forty Wistar rats were divided into normal control group (NC group, $n=10$) and high fat food group (HF group, $n=30$). After the obese model rats established successfully, the rats of NC group ($n=10$) and HF group ($n=10$) were sacrificed. The level of fasting plasma endotoxin (ET) was detected. The expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA in skeletal muscle were detected by real time quantitative PCR. The expression of TLR4, I κ B kinase β (IKK β), phospho-IKK β ^{Ser181} (p-IKK β ^{Ser181}), nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α), insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phospho-IRS-1^{Ser307} (p-IRS-1^{Ser307}) and the tyrosine phosphorylation of IR and IRS-1 (p-IR^{Tyr} and p-IRS-1^{Tyr}) protein in skeletal muscle were detected by Western blot. The twenty HF group rats were randomly divided into two group: the fat model control group (FC group, $n=10$) were fed with high fat diet and distilled water. The fat berberine group (FB group, $n=10$) were fed with high fat diet and berberine. All rats were sacrificed after effective interventions of eight weeks. The same indexes as the first part of experiment were detected. **Results** The results showed that the level of ET was increased. The TLR4/IKK β /NF- κ B signaling pathway is activated and the expression of TNF- α was increased of the skeletal muscle in obese rats. However, the insulin signaling pathways of the skeletal muscle in obese rats was inhibited. Berberine could reduce the level of ET of obese rats, down-regulate the TLR4/IKK β /NF- κ B inflammation signaling pathway and improve insulin resistance of skeletal muscle in obese rats. **Conclusion** Our study revealed that berberine could reduce the level of ET of obese rats, down-regulate the TLR4/IKK β /NF- κ B inflammation signaling pathway in skeletal muscle and berberine can improve insulin resistance of skeletal muscle through inhibiting the active of the TLR4/IKK β /NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Berberine Skeletal muscle Insulin resistance TLR4 IKK β

大量研究表明肥胖诱导的胰岛素抵抗与系统性

慢性低度炎症有关,研究发现高脂饮食可改变大鼠肠道菌群结构,机会致病菌增加,有益菌减少,肠道黏膜通透性增加,引起个体血中肠源性内毒素(ET)

增高^[1]。血浆中 ET 水平升高可激活靶器官 Toll 样受体 4(TLR4)/IKK 激酶 B(IKK β)/核因子- κ B(NF- κ B)内毒素信号通路,该信号通路激活与靶器官胰岛素抵抗密切相关。人体 80% 的葡萄糖是通过骨骼肌摄取和消耗的。骨骼肌作为胰岛素作用的主要靶器官,在肥胖诱导的胰岛素抵抗的发病中有着重要意义。黄连素是从小檗属植物黄连、黄柏根茎中提取出的一种异喹啉类生物碱。越来越多的研究证实黄连素有改善胰岛素抵抗的作用。我们先前的研究也发现黄连素有改善胰岛 α 、 β 细胞的胰岛素抵抗的作用^[2]。目前有研究^[3]发现黄连素可以通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和脂肪酸转移酶的活性来改善 L6 肌管细胞的胰岛素抵抗,但黄连素改善骨骼肌胰岛素抵抗的机制仍不清楚。因此本研究拟观察黄连素对肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 TLR4 及其下游 IKK β /NF- κ B 内毒素炎症信号通路及胰岛素信号通路的影响,进一步探讨黄连素改善骨骼肌胰岛素抵抗的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 196~225 g,SPF 级,购于成都达硕动物有限责任公司。

1.1.2 主要药品和仪器 胰岛素 ELISA 试剂盒,美国 EMD Millipore 公司;内毒素试剂盒,厦门鲎试剂实验厂有限公司;RNA 提取试剂盒,美国 OMEGA 公司;兔抗鼠 TLR4 抗体,兔抗鼠 IKK β 抗体,兔抗鼠 IKK β 181 位丝氨酸磷酸化(p-IKK β ^{Ser181})抗体,兔抗鼠 NF- κ B p65 抗体,兔抗鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抗体,兔抗鼠胰岛素受体(IR) β 亚单位抗体,兔抗鼠胰岛素受体底物-1(IRS-1)抗体,兔抗鼠 IRS 307 位丝氨酸磷酸化(p-IRS-1^{Ser307})抗体,兔抗鼠 IR 酪氨酸磷酸化抗体(p-IR^{Tyr}),兔抗鼠 IRS-1 酪氨酸磷酸化抗体(p-IRS-1^{Tyr})均购自美国 Cell Signaling (CST)公司;盐酸黄连素,四川宏宜生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 建立动物模型 6 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,适应性普通饲料喂养 1 周后,分为正常组(NC 组)10 只和高脂组(HF 组)30 只,NC 组予普通饲料喂养,HF 组予高脂饲料(热量比构成:蛋白 12.8%,脂肪 56.2%,碳水化合物 25.0%)喂养。所有动物均自由饮水、进食,光照时间 8:00~

20:00,每日 15:00~16:00 点换水、加食,每周称 1 次体质量(BM)。根据 BM 判断肥胖模型建立成功与否(即高脂饮食组平均 BM 应超过正常对照组平均 BM 的 20%)。

1.2.2 实验过程及检测指标 28 周肥胖模型建立成功后,所有大鼠禁食 14 h,尾静脉采血测相关生化指标(见 1.2.3)。10 只 NC 组大鼠和随机抽取的 10 只 HF 组大鼠麻醉开腹后门静脉注入胰岛素 90 s 后,取大鼠的骨骼肌组织用于检测 TLR4/IKK β /NF- κ B 及胰岛素信号通路中相关分子的 mRNA 及蛋白的表达,检测内脏脂肪(VF)质量。其余 20 只 HF 组大鼠随机分为黄连素干预组(FB 组)和肥胖模型对照组(FC 组),每组 10 只。两组均继续高脂饮食喂养,FC 组每日 2 mL 蒸馏水灌胃,FB 组每日 1 次黄连素 200 mg/(kg·d)的剂量灌胃,共干预 8 周。干预结束后(第 36 周)处理及主要检测指标同第 28 周。

1.2.3 血糖、胰岛素及血浆 ET 的检测 血糖仪检测空腹血糖(FPG),胰岛素 ELISA 试剂盒检测大鼠血清空腹胰岛素水平(FINS),内毒素试剂盒检测血浆 ET 水平。

1.2.4 RT-PCR 检测骨骼肌组织 TLR4 mRNA 表达 Trizol 法提取总 RNA,取 1 μ g RNA 进行逆转录,其操作步骤按照试剂盒说明进行。将逆转录产物 cDNA 用引物进行 PCR 反应。TLR4 引物:上游引物 5'-GCCGGAAGTTATTGTGGTGGT-3',下游引物 5'-ATGGGTTTAGGCGCAAAGTTT-3',扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环。扩增产物经 25 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶分析系统进行分析并照相。以 β -actin 为内对照,扫描并分析 TLR-4 mRNA 电泳条带的平均光密度(AOD)值,以 TLR-4 mRNA 电泳条带与 β -actin 电泳条带的 AOD 值的比值表示 TLR-4 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测骨骼肌中 TLR4、IKK β 、p-IKK β ^{Ser181}、细胞核 NF- κ B、TNF- α 、IR、IRS-1、p-IRS^{Ser307} 表达水平 研磨骨骼肌组织并充分裂解细胞后,14 000 r/min 离心 5 min,收集上清,BCA 法测定蛋白浓度。每个样品(25 μ g)与等体积的 2 \times 上样 buffer 混匀,煮沸 5 min,120 g/L SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白质转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉(TBS,0.1% Tween-20)封闭 2 h 后,与第一抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,然后加入 HRP 标记的第二抗体,孵育 1 h,ECL 化学发光剂显色发光,暗室 X-ray 胶片曝

光显影。以各目的条带与 β -actin电泳条带AOD值的比值表示各目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 免疫沉淀及Western blot检测骨骼肌中IR、IRS-1酪氨酸磷酸化水平 细胞内总蛋白的提取及浓度测定方法同前;各取100 μ g总蛋白,分别加入抗IR和IRS-1抗体(工作浓度1:2000),4 $^{\circ}$ C孵育轻摇过夜,加入100 μ L 10% A-Sepharose进行沉淀,洗涤免疫沉淀复合物后加入50 μ L 2 \times SDS上样缓冲液煮沸5 min;离心3 min,取上清,按前述方法电泳、转膜、封闭过夜,加抗磷酸酪氨酸抗体(工作浓度1:1000),洗膜,加辣根过氧化物酶标记的二抗(工作浓度1:5000);曝光,洗片。以各目的条带与 β -actin电泳条带AOD值的比值表示各目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

表1 各组BM、FPG、FINS、HOMA-IR及ET水平比较($n=10$)

Table 1 The body mass, the fasting plasma glucose, fasting insulin, homeostasis model of assessment for insulin resistance index and endotoxin in each group ($n=10$)

	NC group Week 28	HF group Week 28	FC group			FB group		
			Week 28	Week 36	Δ_1	Week 28	Week 36	Δ_2
BM (g)	503.20 \pm 41.51	643.82 \pm 90.91 \blacktriangledown	584.22 \pm 37.90	606.10 \pm 60.01	22.42 \pm 22.40	584.20 \pm 39.01	586.80 \pm 46.91	2.60 \pm 1.93*
FBG (mmol/L)	5.55 \pm 0.80	7.50 \pm 0.94 \blacktriangledown	7.90 \pm 0.63	8.14 \pm 0.93	0.22 \pm 0.34	7.72 \pm 1.31	6.41 \pm 0.62 \blacksquare	-1.00 \pm 0.50*
FINS (ng/mL)	1.94 \pm 0.85	2.57 \pm 1.77 \blacktriangledown	2.31 \pm 1.80	2.40 \pm 1.40	0.11 \pm 0.74	2.50 \pm 2.01	0.50 \pm 0.20 \blacksquare	-2.03 \pm 0.62*
HOMA-IR	10.19 \pm 5.72	15.01 \pm 14.26 \blacktriangledown	39.33 \pm 20.80	40.22 \pm 33.31	0.92 \pm 12.43	43.20 \pm 26.32	13.50 \pm 8.41 \blacksquare	-29.68 \pm 8.73*
ET (EU/mL)	0.08 \pm 0.04	0.15 \pm 0.07 \blacktriangledown	0.18 \pm 0.10	0.32 \pm 0.09	0.14 \pm 0.04	0.29 \pm 0.13	0.15 \pm 0.07 \blacksquare	-0.14 \pm 0.05*

BM: Body mass; FBG: Fasting blood glucose; FINS: Fasting insulin; HOMA-IR: Homeostasis model of assessment for insulin resistance index; Δ_1 = Week 36 - Week 28 in FC group; Δ_2 = Week 36 - Week 28 in FB group. \blacktriangledown $P < 0.05$, vs. NC group; \blacksquare $P < 0.05$, vs. Week 28 in FB group; * $P < 0.05$, vs. Δ_1

2.2 大鼠VF、VF/BM、骨骼肌TLR4 mRNA及TLR4/IKK β /NF- κ B信号通路中各蛋白的表达

见图1,表2,图2。28周时与NC组相比, HF组VF及VF/BM升高($P < 0.05$)。36周时FC组与FB组VF及VF/BM两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。28周时与NC组相比, HF组大鼠骨骼肌TLR4 mRNA、TLR4蛋白、TNF- α 蛋白、细胞核NF- κ B蛋白表达及IKK β ^{Ser181}磷酸化水平升高($P < 0.05$)。36周时,与FC组相比, FB组大鼠骨骼肌TLR4 mRNA、TLR4蛋白、TNF- α 蛋白、细

表2 各组大鼠VF、VF/BM、骨骼肌TLR4 mRNA、TLR4蛋白、IKK β 蛋白、p-IKK β ^{Ser181}蛋白及细胞核NF- κ B蛋白、TNF- α 蛋白的表达

Table 2 The visceral fat, visceral fat/body mass and the expression of TLR4 mRNA, TLR4, IKK β , p-IKK β ^{Ser181}, NF- κ B, TNF- α protein

	Week 28		Week 36	
	NC group ($n=10$)	HF group ($n=10$)	FC group ($n=10$)	FB group ($n=10$)
VF (g)	13.09 \pm 8.18	47.91 \pm 20.29 \blacktriangle	52.60 \pm 18.10	47.40 \pm 20.20
VF/BM	0.02 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02 \blacktriangle	0.12 \pm 0.10	0.09 \pm 0.03
TLR4 mRNA (AOD value)	1.00 \pm 0.63	1.75 \pm 0.36 \blacktriangle	1.00 \pm 0.53	0.55 \pm 0.10 \blacklozenge
TLR4 (AOD value)	0.71 \pm 0.16	1.56 \pm 0.43 \blacktriangle	1.46 \pm 0.32	0.72 \pm 0.16 \blacklozenge
IKK β (AOD value)	1.89 \pm 0.15	1.86 \pm 0.13	1.92 \pm 0.12	1.91 \pm 0.15
p-IKK β ^{Ser181} (AOD value)	0.20 \pm 0.09	1.49 \pm 0.19 \blacktriangle	1.71 \pm 0.16	0.70 \pm 0.13 \blacklozenge
NF- κ B (AOD value)	0.19 \pm 0.02	0.63 \pm 0.15 \blacktriangle	0.72 \pm 0.13	0.38 \pm 0.08 \blacklozenge
TNF- α (AOD value)	0.17 \pm 0.06	0.89 \pm 0.19 \blacktriangle	0.97 \pm 0.14	0.57 \pm 0.12 \blacklozenge

VF: Visceral fat; VF/BM: Visceral fat/body mass. \blacktriangle $P < 0.05$, vs. NC group at Week 28; \blacklozenge $P < 0.05$, vs. FC group at Week 36

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验或配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠BM及生化指标的比较

见表1。28周模型建立成功时,与NC组大鼠相比, HF组大鼠BM、FBG、FINS、HOMA-IR及ET水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。28周时FC组与FB组大鼠BM、FBG、FINS、HOMA-IR及ET的组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。黄连素干预8周后(第36周), FC组与FB组干预前后BM的差值组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄连素干预8周后, FB组FBG、FINS、HOMA-IR及ET水平较干预前降低($P < 0.05$),且降低量在FC组与FB组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

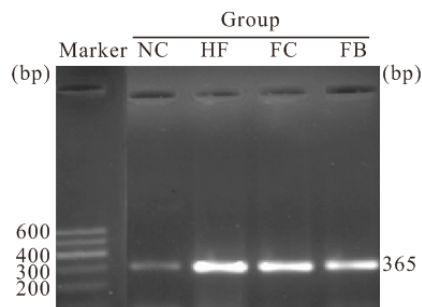


图1 RT-PCR检测TLR4 mRNA表达

Fig 1 The expression of TLR4 mRNA in each group

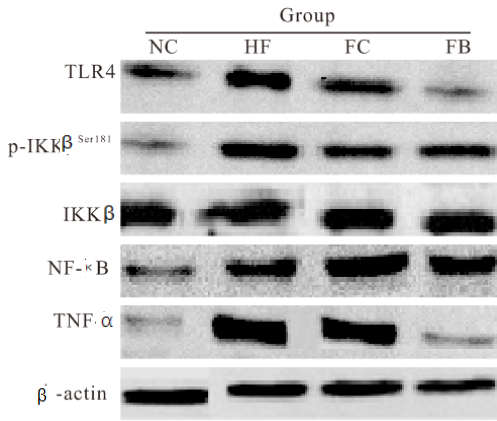


图 2 Western blot 检测 TLR4 蛋白、IKK β 、p-IKK β ^{Ser181}、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达

Fig 2 The expression of TLR4, IKK β , p-IKK β ^{Ser181}, NF- κ B, TNF- α protein in each group detected by Western blot

胞核 NF- κ B 蛋白表达及 IKK β ^{Ser181} 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$)。

2.3 大鼠骨骼肌 p-IR^{Tyr}、p-IRS^{Ser307}、p-IRS-1^{Tyr} 蛋白的表达

见图 3, 表 3。28 周时, 与 NC 组相比, HF 组

表 3 大鼠骨骼肌 IR、IRS-1、p-IRS-1^{Ser307}、p-IR^{Tyr}、p-IRS-1^{Tyr} 蛋白的表达 (AOD 值)

Table 3 The expression of IR, IRS-1, phospho-IRS-1^{Ser307}, phospho-IR^{Tyr}, phospho-IRS-1^{Tyr} protein in each group (AOD value)

	Week 28		Week 36	
	NC group (n=10)	HF group (n=10)	FC group (n=10)	FB group (n=10)
IR	1.08 \pm 0.15	1.03 \pm 0.15	1.15 \pm 0.30	1.10 \pm 0.24
p-IR ^{Tyr}	0.57 \pm 0.15	0.29 \pm 0.12 \blacktriangle	0.19 \pm 0.08	0.43 \pm 0.13 \blacklozenge
IRS-1	1.09 \pm 0.17	1.05 \pm 0.14	1.19 \pm 0.32	1.11 \pm 0.24
p-IRS ^{Ser307}	0.26 \pm 0.19	0.60 \pm 0.20 \blacktriangle	0.75 \pm 0.12	0.34 \pm 0.10 \blacklozenge
p-IRS-1 ^{Tyr}	0.61 \pm 0.16	0.22 \pm 0.13 \blacktriangle	0.19 \pm 0.07	0.64 \pm 0.11 \blacklozenge

p-IR^{Tyr}: The tyrosine phosphorylation of IR; p-IRS^{Ser307}: The Ser307 phosphorylation of IRS-1; p-IRS-1^{Tyr}: The tyrosine phosphorylation of IRS-1.

1. $\blacktriangle P < 0.05$, vs. NC group at Week 28; $\blacklozenge P < 0.05$, vs. FC group at Week 36

3 讨论

本研究结果显示高脂饮食诱导的肥胖胰岛素抵抗大鼠与正常组相比血浆中 ET 水平及骨骼肌 TLR4 mRNA 及蛋白表达显著增高, p-IKK β ^{Ser181}、细胞核 NF- κ B 蛋白及炎症因子 TNF- α 蛋白表达均上调。这与先前 Oliveirn 等^[4]的研究结果相似。

本研究发现黄连素可降低肥胖胰岛素抵抗大鼠血浆中 ET 水平, 我们考虑这与黄连素能改善大鼠肠道菌群结构及改善肠道黏膜通透性有关。且本研究发现黄连素可下调肥胖胰岛素抵抗大鼠内毒素信号通路中 TLR4 mRNA 及蛋白、p-IKK β ^{Ser181}、细胞核 NF- κ B 蛋白及炎症因子 TNF- α 蛋白的表达, 说明黄连素可降低肥胖胰岛素抵抗大鼠血浆 ET 水平, 下调骨骼肌 TLR4/IKK β /NF- κ B 内毒素信号通路, 减少炎

症因子 TNF- α 产生。先前 Yi 等^[5]用软脂酸孵育 3T3-L1 脂肪细胞可使脂肪细胞 p-IKK β ^{Ser181} 及细胞核 NF- κ B 水平上调, 且加入黄连素孵育后可下调脂肪细胞诱导的 3T3-L1 脂肪细胞以上两种蛋白的表达, 提示黄连素可抑制 3T3-L1 脂肪细胞的内毒素信号通路的激活。

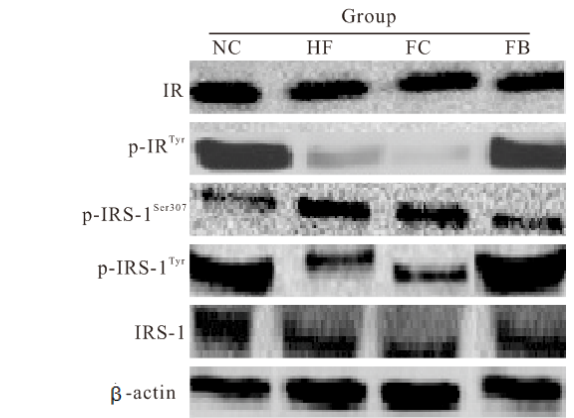


图 3 Western blot 检测各组大鼠骨骼肌 IR、IRS-1、p-IRS-1^{Ser307}、p-IR^{Tyr}、p-IRS-1^{Tyr} 蛋白的表达

Fig 3 The expression of IR, IRS-1, phospho-IRS-1^{Ser307}, phospho-IR^{Tyr}, phospho-IRS-1^{Tyr} protein in each group detected by Western blot

p-IRS^{Ser307}: The Ser307 phosphorylation of IRS-1

生理情况下^[6], 胰岛素与靶器官细胞膜上的 IR 结合, 引起 IR 酪氨酸磷酸化, 从而导致 IRS-1 的酪氨酸磷酸化, IRS-1 酪氨酸磷酸化后可激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3-K), 从而进一步激活 Akt 和 (或) 非典型蛋白激酶 C (aPKC), 两者介导葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 从胞质转位至胞膜, 使葡萄糖从细胞外转运到细胞内, 由 GLUT4 完成胰岛素刺激的骨骼肌细胞葡萄糖摄取。在病理情况下, 如当靶细胞受到细菌、前炎症细胞因子、ET 的刺激后, 靶细胞内 IR 酪氨

酸磷酸化水平降低, IRS-1^{Ser307}磷酸化水平升高, 从而阻碍 IRS-1 的酪氨酸磷酸化, 使胰岛素信号向下游 PI3K 的传递受阻, 从而削弱胰岛素刺激的骨骼肌葡萄糖摄取, 最终引起胰岛素抵抗^[7-9]。本研究结果显示高脂饮食诱导的肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IR 酪氨酸磷酸化水平降低, IRS-1^{Ser307}磷酸化水平升高, IRS-1 酪氨酸磷酸化水平降低, 表明肥胖大鼠出现胰岛素抵抗, 而黄连素可上调 IR 及 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平, 下调 IRS-1^{Ser307}磷酸化水平, 改善骨骼肌胰岛素抵抗。

Radin 等^[10]给正常大鼠输注游离脂肪酸后引起大鼠骨骼肌出现胰岛素抵抗, 而给敲除 TLR4 基因的大鼠输注游离脂肪酸后可避免大鼠骨骼肌出现胰岛素抵抗。该研究者进一步用棕榈酸酯孵育大鼠的 L6 肌小管细胞, L6 肌小管细胞出现了胰岛素抵抗, 且细胞中 IKK β /NF- κ B 信号通路被激活, 而在棕榈酸酯中加入 TLR4 抑制剂可以避免 L6 肌小管细胞胰岛素抵抗的发生及 IKK β /NF- κ B 信号通路激活。说明抑制 TLR4/IKK β /NF- κ B 信号通路的激活可改善 L6 肌小管细胞胰岛素抵抗。本研究用黄连素给高脂诱导的肥胖胰岛素抵抗大鼠灌胃后发现大鼠骨骼肌胰岛素抵抗得到改善, 且黄连素抑制了肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 TLR4/IKK β /NF- κ B 信号通路。故我们考虑黄连素改善肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的机制之一是通过下调骨骼肌 TLR4/IKK β /NF- κ B 内毒素信号通路减少炎症因子 TNF- α 产生所致。该信号通路可以从两方面引起靶器官胰岛素抵抗: 首先, 该信号通路中 IKK β 活性升高可直接导致 IRS-1 酪氨酸磷酸化受阻进而引起胰岛素信号传导障碍导致靶器官胰岛素抵抗, 其次该信号通路可通过激活 NF- κ B 介导一系列炎症因子的表达, 导致机体呈慢性炎症状态, 间接引起靶器官胰岛素抵抗^[11-13]。

本研究存在一定的局限性: 首先, 本实验研究黄连素改善骨骼肌胰岛素抵抗机制仅在动物模型上进行, 还需有细胞培养进行深入研究加以证明; 其次, 本研究未使用 TLR4/IKK β /NF- κ B 信号通路分子拮抗剂来进行研究, 故本研究未能从反面充分证明黄连素可通过 TLR4/IKK β /NF- κ B 内毒素信号通路改善骨骼肌胰岛素抵抗的机制, 有待进一步研究。

综上, 本研究显示黄连素可改善肥胖胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素抵抗, 其机制可能是通过下调骨骼

肌 TLR4/IKK β /NF- κ B 内毒素信号通路减少炎症因子 TNF- α 产生所致。

参 考 文 献

- 1 Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008; 57(6): 1470-1481.
- 2 Gu JJ, Gao FY, Zhao TY. A preliminary investigation of the mechanisms underlying the effect of berberine in preventing high-fat diet-induced insulin resistance in rats. *J Physiol Pharmacol*, 2012; 63(5): 505-513.
- 3 Chen Y, Li Y, Wang Y, *et al.* Berberine improves free-fatty-acid-induced insulin resistance in L6 myotubes through inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma and fatty acid transferase expressions. *Metabolism*, 2009; 58(12): 1694-1702.
- 4 Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, *et al.* Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*, 2011; 60(3): 784-796.
- 5 Yi P, Lu FE, Xu LJ, *et al.* Berberine reverses free-fatty-acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting IKKbeta. *World J Gastroenterol*, 2008; 14(6): 876-883.
- 6 Areias MF, Prada PO. Mechanisms of insulin resistance in the amygdala; influences on food intake. *Behav Brain Res*, 2015; 282(C): 209-217.
- 7 Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*, 2014; 220(2): 1-23.
- 8 Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J*, 2014; 61(7): B4890.
- 9 Jiang Y, Biswas SK. Serine 307 on insulin receptor substrate 1 is required for SOCS3 and TNF-alpha signaling in the rMC-1 cell line. *Mol Vis*, 2014; 20(1): 1463-1470.
- 10 Radin M, Sinha S, Bhatt B, *et al.* Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia*, 2008; 51(2): 336-346.
- 11 Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, *et al.* Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27(1): 84-91.
- 12 Zhang J, Wu W, Li D, *et al.* Overactivation of NF-kappaB impairs insulin sensitivity and mediates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrine*, 2010; 37(1): 157-166.
- 13 Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*, 2010; 24(8): 2596-2611.

(2015-01-30 收稿, 2015-05-15 修回)

编辑 吕 熙