

表没食子儿茶素没食子酸酯对高脂饮食大鼠脂肪组织中胰岛素信号传导通路的影响

曹艳丽 暴素青 范雨鑫 白淑亭 单忠艳

【摘要】 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对高脂饮食大鼠脂肪组织中胰岛素信号传导机制的影响。方法 将30只4周龄SPF级雄性SD大鼠随机分为正常饮食组($n=10$)和高脂饮食组($n=20$)。喂养16周,当两组大鼠体质量出现显著差异后($P<0.05$),将高脂饮食组按随机区组原则分为高脂饮食组($n=10$)和EGCG干预组(高脂饮食含0.32% EGCG, $n=10$)。干预16周后检测每组大鼠空腹血糖及胰岛素水平,并计算HOMA-IR指数;应用Western blot方法检测附睾周脂肪组织中胰岛素信号通路中关键分子p-IRS-1、PI3K、GLUT4蛋白的水平。结果 (1)与高脂饮食组相比,EGCG干预组空腹胰岛素水平显著下降[EGCG干预组(13.83 ± 0.79)mIU/L,高脂饮食组(31.71 ± 3.61)mIU/L, $P=0.004$];EGCG干预组HOMA-IR指数明显改善(EGCG干预组 3.36 ± 0.31 ,高脂饮食组 7.59 ± 0.99 , $P=0.007$);正常饮食组、高脂饮食组和EGCG干预组大鼠空腹血糖水平无统计学差异。(2)Western blot结果显示,与高脂饮食组相比,EGCG干预组大鼠附睾脂肪组织中p-IRS-1Ser307蛋白水平明显下降,约为高脂饮食组的62.19% ($P=0.005$);PI3K及GLUT4水平明显升高,分别为高脂饮食组的2.35倍 ($P=0.000$)和2.03倍 ($P=0.007$)。结论 EGCG可能通过调控高脂饮食大鼠脂肪组织胰岛素信号传导通路中关键蛋白表达,改善胰岛素敏感性。

【关键词】 脂肪组织; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 高脂饮食; 胰岛素抵抗

Improvement of epigallocatechin-3-gallatein on the insulin signaling in adipose tissue of obesity rats CAO Yan-li,BAO Su-qing,FAN Yu-xin,BAI Shu-ting,SHAN Zhong-yan.Department of Endocrinology and Metabolism, Institute of Endocrinology, Liaoning Provincial Key Laboratory of Endocrine Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: CAO Yan-li, Email: vanilla421@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of epigallocatechin-3-gallatein on the insulin signaling in adipose tissues of rats fed a high-fat diet. **Methods** 30 male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: standard diet (NC, $n=10$) and high-fat diet (HFD, $n=20$). When there was a significant difference of body weight between the two groups ($P<0.05$), the HFD group was divided into two subunits: the HFD group (HFD, $n=10$, 16 weeks) and the EGCG group (HFD+0.32% EGCG, $n=10$, 16 weeks). Plasma glucose and fasting plasma insulin levels were assessed. Insulin resistance was calculated by the homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR index). The key proteins levels of insulin signaling were examined in epididymal white fat tissues (eWAT) by Western-blotting. **Results** (1) In the EGCG group, there were significant decreases in fasting plasma insulin [13.83 ± 0.79 mIU/L vs. (31.71 ± 3.61) mIU/L, separately, $P=0.004$], HOMA-IR (3.36 ± 0.31 vs. 7.59 ± 0.99 , $P=0.007$), compared to the HFD group. (2) The protein level of p-IRS-1 Ser307 in the EGCG group was significantly lower, about 62.19% that of the HFD group ($P=0.005$) and the levels of PI3K and GLUT4 expression were 2.35 times and 2.03 times separately that of the HFD group ($P=0.000$ and $P=0.007$, separately); there were no significances between the NC group and the EGCG group. **Conclusion** EGCG enhances insulin sensitivity may correlated with improving the expression of key proteins of insulin signaling in adipose tissue of high-fat diet rats.

【Key words】 Adipose tissue; Epigallocatechin-3-gallatein; Diet, high-fat; Insulin resistance

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)作为绿茶中的主要活性成分(约占绿茶儿茶素 60%),对肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化等多种疾病均具有明显的药理作用^[1-2]。但目前 EGCG 如何作用于脂肪组织,改善胰岛素抵抗机制研究甚少。本研究以高脂饲料喂养建立肥胖模型,并给予 EGCG 干预,观察脂肪组织中胰岛素信号传导关键蛋白表达变化,旨在探讨 EGCG 对胰岛素敏感性的影响及机制。

材料与方法

1. 主要试剂:兔抗大鼠磷酸化胰岛素受体底物-1(p-IRS-1) Ser307、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)及葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)一抗均购自 Cell Signal Technology 公司;内参兔抗小鼠 β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司;山羊抗兔-IgG 购自北京中杉公司;全蛋白提取试剂盒购自凯基公司;血糖试纸购自罗氏公司;胰岛素测定碘(¹²⁵I)放免试剂盒购自北京原子高科公司;EGCG(纯度 $\geq 98\%$)购于 Cayman 公司。

2. 肥胖大鼠模型建立:SPF 级健康 4 周龄雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 85~108 g,购自北京华阜康动物饲养公司。实验前适应性喂养 1 周后,随机分为正常饮食组($n=10$)和高脂饮食组($n=20$)。大鼠饲养于中国医科大学动物饲养中心,每笼 5 只,温度控制在(22 \pm 2)℃,湿度控制在 55%~60%,明暗交替周期为 12 h。正常饮食组基础饲料由中国医科大学实验动物中心提供,含蛋白质 28.58%、脂肪 9.59%、碳水化合物 61.83%。高脂饮食组高脂饲料,含蛋白质 15%,脂肪 60%,碳水化合物 25%,经钴源辐照后使用。喂养期间自由摄食和饮水,每周固定时间称重,记录大鼠生长曲线。喂养 16 周后,正常饮食组和高脂饮食组大鼠体重出现明显差异($P<0.05$),开始进入 EGCG 干预阶段。此实验的所有过程均按照国家卫生研究所实验动物使用规章进行。

3. 肥胖模型建立后,将高脂饮食组大鼠按照随机区组原则分为两组:高脂饮食组($n=10$)和 EGCG 干预组(高脂饮食中含 0.32% EGCG,相当于每 200 ml 杯中含 2 g 茶叶,共 10 杯, $n=10$),余喂养条件不变。每周监测大鼠体重及摄食量。干预 16 周。

4. 标本采集及测定:大鼠禁食 14 h,称重,10%水合氯醛(0.3 mg/kg)腹腔注射麻醉,心尖取血,立即 4℃低温下 1500 \times g 离心 10 min,分离血清置-80℃冰箱冻存备用。迅速取出附睾周脂肪组织,剔除血管及其他结缔组织置于冻存管后放入液氮中,过夜后移至-80℃冰箱中冻存备用。

5. 大鼠空腹血糖(FBG)及基础胰岛素(FINS)

测定:尾静脉采血测定三组大鼠 FBG(罗氏血糖仪);利用碘(¹²⁵I)放免试剂盒测定 FINS,并计算胰岛素抵抗指数 HOMA-IR。HOMA-IR=FBG(mmol/L) \times FINS(mIU/L)/22.5。

6. Western blot 方法检测大鼠附睾脂肪组织中胰岛素信号传导关键蛋白水平:剪取约 100 mg 附睾周脂肪组织依次加入适量的裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及 PMSF(KGP 250 kit),匀浆(8 min \times 2 次),匀浆后置于冰浴中 30 min,5000 \times g 离心 30 min,取管底清液,BCA 法测定蛋白浓度,定量,加入等体积的 SDS-PAGE 样品缓冲液,于 100℃煮沸 5 min,放于-20℃保存备用。

待所有样品获得后加样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,其后转移至 PVDF 膜,用 TBST 洗膜(3 次,每次 5 min),用含 5% BSA TBST 缓冲液室温封闭 1 h,加一抗 4℃过夜孵育,洗膜,二抗孵育 1 h,洗膜,用增强型化学发光法(ECL)显色,成像检测系统观察(Alphaview 1.3),利用 Image-pro Plus 6.0 图像处理软件定量分析 p-IRS-1 Ser307、PI3K、GLUT4 和 β -actin 条带的灰度值。

7. 统计学分析:所有统计资料用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据进行正态性检验后以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异比较采用单因素 ANOVA 方法分析,两两比较采用 Bonferoni 法, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. EGCG 对大鼠生理及代谢指标的影响:为了评估 EGCG 对机体代谢改变,研究观察了各组大鼠体重、摄食量、FBG、FINS 及 HOMA-IR 水平的变化(表 1)。EGCG 干预前高脂饮食组大鼠体重[(520.02 \pm 9.35)g]高于正常饮食组[(487.01 \pm 8.20)g, $P=0.035$];EGCG 干预后,在摄食量无明显差异情况下,EGCG 组大鼠体重下降,空腹胰岛素($P=0.004$)及 HOMA-IR 值($P=0.007$)较 HFD 组均出现明显下降,表明 EGCG 改善了肥胖大鼠胰岛素敏感性;三组大鼠空腹血糖水平无统计学差异。

2. EGCG 对大鼠脂肪组织中胰岛素信号传导通路中关键蛋白表达水平的影响:Western blot 结果显示(图 1),与高脂饮食组相比,EGCG 干预组大鼠附睾脂肪组织中 p-IRS-1 Ser307 蛋白水平明显下降,约为高脂饮食组的 62.19%($P=0.005$,图 1A);EGCG 干预组脂肪组织中 PI3K 及 GLUT4 水平明显升高,分别为高脂饮食组的 2.35 倍($P=0.000$,图 1B)和 2.03 倍($P=0.007$,图 1C)。

表1 EGCG对大鼠代谢相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	EGCG 干预后体重 (g)	FINS (mIU/L)	FBG (mmol/L)	摄食量 ($\text{g} \cdot \text{只}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	HOMA-IR
正常饮食组(NC 组)	10	578.28 ± 6.19	14.64 ± 0.66	5.26 ± 0.22	158.89 ± 9.86	3.40 ± 0.15
高脂饮食组(HFD 组)	10	634.23 ± 23.26 ^a	31.71 ± 3.61 ^b	5.33 ± 0.67	137.57 ± 10.71	7.59 ± 0.99 ^b
EGCG 干预组	10	588.72 ± 16.09	13.83 ± 0.79 ^c	5.44 ± 0.30	130.71 ± 11.48	3.36 ± 0.31 ^c

注: 摄食量指干预阶段每只大鼠每天进食量; 与正常饮食组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与高脂饮食组比较, ^c $P < 0.05$

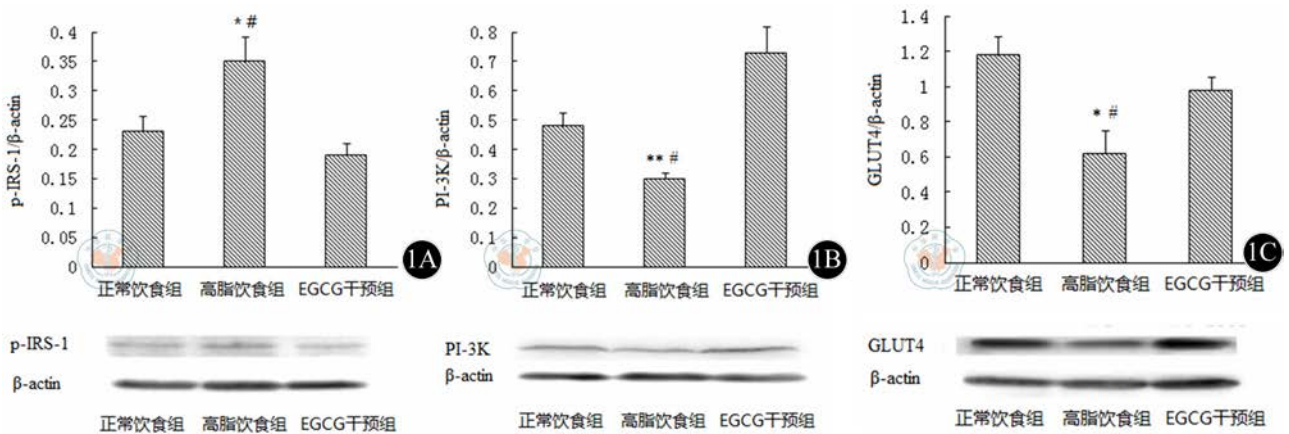


图1 三组大鼠附睾周脂肪组织中p-IRS-1 Ser307、PI3K及GLUT4蛋白表达。与正常对照组相比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与EGCG干预组相比较, [#] $P < 0.01$

讨论

肥胖症易引发胰岛素抵抗、糖尿病、心血管系统疾病等, 严重地威胁着人类的健康及生活质量, 肥胖已越来越成为国际社会关注的重大问题。研究表明, 超重和肥胖是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病流行的主要原因^[3]。胰岛素受体后信号转导异常, 在胰岛素抵抗中发挥着重要作用, 而胰岛素受体底物是传导通路中受体后水平重要信号蛋白, 其酪氨酸磷酸化是信号转导中主要环节^[4-5]。

EGCG 作为绿茶中的主要成分, 近年来大量的研究表明, 其具有清除自由基、抗脂质过氧化、抗突变、抗肿瘤、抗炎、抗病毒和增强机体免疫功能等多种生物学效应, 对肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化等多种疾病均具有明显的药理作用^[6-7]。近来的动物研究中发现^[8], 在高脂饮食喂养导致的肥胖小鼠中, 通过长期喂养 EGCG 可改善肥胖、代谢综合征的各种表现及脂肪肝等。EGCG 改善胰岛素抵抗机制的相关研究表明^[9], 给大鼠每日摄取 75 mg/kg 的 EGCG 可改善大鼠骨骼肌中 GLUT4 的转位, 从而改善胰岛素抵抗。在非酒精性脂肪肝小鼠的研究中发现^[10], 喂养 EGCG 可增加肝脏组织中 IRS-1 酪氨酸的磷酸化水平, 改善胰岛素抵抗状态。本研究则进一步探讨了 EGCG 对脂肪组织中胰岛素信号通路传导的改善作用及机制。

本研究发现, EGCG 干预 16 周后, 大鼠血清空腹胰岛素及 HOMA-IR 明显下降, 验证了其对于胰岛素敏

感性的改善具有良好的生物学活性。在对其机制的相关研究中发现, EGCG 干预后, 胰岛素信号通路中关键蛋白胰岛素受体底物-1-丝氨酸的磷酸化水平降低, 胰岛素受体后信号传导增强; 此外, 磷脂酰肌醇 3 激酶水平升高, 作为葡萄糖转运体 4 转位的关键物质, 促进了葡萄糖的转运和利用, 增加了胰岛素敏感性。

综上所述, 可推测 EGCG 可能通过调控高脂饮食大鼠脂肪组织胰岛素信号传导通路中关键蛋白表达, 改善胰岛素敏感性。近来研究发现, 肥胖相关的胰岛素抵抗是一种慢性低度、代谢性炎症性疾病^[11]。这种代谢性炎症发生在机体众多组织中, 如脂肪、肝脏、肌肉等, 共同介导了代谢紊乱和胰岛素抵抗的发生^[12]。EGCG 是否可通过调节炎症反应来调节胰岛素信号传导通路中关键蛋白表达, 尚需要进一步研究。深入了解肥胖相关的胰岛素抵抗的发生机制, 将为肥胖相关代谢紊乱的预防和诊治提供新的治疗方案。

参考文献

- [1] Mangine GT, Gonzalez AM, Wells AJ, et al. The effect of a dietary supplement (N-oleyl-phosphatidyl-ethanolamine and epigallocatechin gallate) on dietary compliance and body fat loss in adults who are overweight: a double-blind, randomized control trial. *Lipids Health Dis*, 2012, 11:127.
- [2] Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50:176-187.
- [3] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 2006, 444:840-846.
- [4] Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes*, 2006, 55:2392-2397.

- [5] Musi N, Goodyear LJ. Insulin resistance and improvements in signal transduction. *Endocrine*, 2006, 29:73-80.
- [6] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82:1807-1821.
- [7] Saito ST, Gosmann G, Pungartnik C, et al. Green tea extract-patents and diversity of uses. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 2009, 1:203-215.
- [8] Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, 2002, 23:201-229.
- [9] Farmer SR, Auwerx J. Adipose tissue: new therapeutic targets from molecular and genetic studies--IASO Stock Conference 2003 report. *Obes Rev*, 2004, 5:189-196.
- [10] Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997, 37:693-704.
- [11] Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*, 2013, 339:172-177.
- [12] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29:415-445.

(收稿日期: 2013-05-20)

(本文编辑: 戚红丹)

曹艳丽, 暴素青, 范雨鑫, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对高脂饮食大鼠脂肪组织中胰岛素信号传导通路的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (14): 6501-6504.

