

• 研究论文 •

青砖茶水提物对糖尿病模型大鼠肝脏组织对氧磷酶 3 和鸢尾素表达的干预作用

刘云涛^{①②}, 曾钰钦^②, 何建刚^①, 潘敬芳^②, 吴 娇^②

[摘要] 目的 观察青砖茶水提物对糖尿病模型大鼠肝脏对氧磷酶 3、鸢尾素表达的干预作用。方法 SD 大鼠随机分为正常对照组(NC 组)、糖尿病组(DM 组)、青砖茶组(T+DM 组), 每组 20 只。Western blot 检测肝脏组织对氧磷酶 3、鸢尾素、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)、过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α) 的蛋白表达, RT-PCR 测对氧磷酶 3、鸢尾素、PI3K/Akt、PGC-1 α mRNA 的表达, 观察青砖茶的干预作用。结果 (1) DM 组、T+DM 组 FPG、FIns、TG、HOMA-IR、白细胞介素-6(IL-6)、丙二醛(MDA)水平较 NC 组高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), T+DM 组较 DM 组低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (2) 肝脏对氧磷酶 3、鸢尾素、PI3K/Akt、PGC-1 α 的表达依次为 NC 组、T+DM 组、DM 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 对氧磷酶 3、鸢尾素在糖尿病大鼠肝脏的表达降低, 青砖茶水提物通过调控糖尿病大鼠肝脏鸢尾素、对氧磷酶 3 的表达可能是其改善胰岛素抵抗、糖脂代谢的部分机制。

[关键词] 糖尿病; 氧磷酶 3; 鸢尾素; 青砖茶

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2018)5-0383-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2018.05.001

Effect of Qingzhuan Tea on Expressions of Paraoxonase-3 and Irisin in Livers of Diabetic Rats

LIU Yun-tao^{①②}, ZENG Yu-qin^②, HE Jian-gang^①, PAN Jing-fang^②, WU Jiao^②

^①Changshengchuan Qingzhuan Tea Research Institute of Hubei, Yichang 443000, China;

^②Department of Endocrinology, Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China

[Abstract] **Objective** To observe the expressions of Paraoxonase-3 (pon3) and Irisin in the liver of diabetic rats and their changes under Changshengchuan Qingzhuan tea intervention. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomized into the normal control (NC) group, diabetes (DM) group and Changshengchuan Qingzhuan tea treatment (T+DM) group ($n = 20$). Western blot assay was adopted to detect the expressions of pon3, Irisin, PI3K/Akt and PGC-1 α while RT-PCR was used to observe the expressions of pon3, PI3K/Akt, Irisin, PI3K/Akt and PGC-1 α mRNA. **Results** The levels of FBG, FFA, FIns, TG, HOMA-IR, IL-6, and malondialdehyde (MDA) were significantly higher in the DM group and T+DM group than in the NC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the DM group, those levels in the T+DM group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expressions of pon3, Irisin, PI3K/Akt and PGC-1 α in the liver were the highest in the NC group, followed by the T+DM group and DM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Expressions of pon3 and Irisin are reduced in the liver of diabetic rats. Increasing the expressions of pon3 and Irisin in the liver may be one of the mechanisms by which Changshengchuan Qingzhuan tea improves insulin resistance and lipid and glucose metabolism.

[Key words] diabetes mellitus; Paraoxonase-3; Irisin; Qingzhuan tea

基金项目: 湖北长盛川青砖茶研究所开放基金, No.2017MS02; 宜昌市科技局计划课题, No.A15301-26

作者简介: 刘云涛, 副主任医师。研究方向: 糖尿病及其并发症。

作者单位: ① 443000 湖北宜昌, 湖北长盛川青砖茶研究所;

② 443000 湖北宜昌, 三峡大学附属仁和医院内分泌科

国外学者研究发现黑茶提取物可促进糖尿病大鼠受损胰岛细胞的增殖, 并且其抗氧化应激作用也对胰岛 β 细胞发挥了保护作用^[1]。实验还发现黑茶中的代表性茶叶青砖茶水提物可抑制 α -淀粉酶、抗氧化应激, 其降低血糖的作用可能使其成为糖尿病

的辅助性治疗措施^[2]。同时,黑茶还可减少高脂饲养大鼠的内脏脂肪^[3]。这些说明黑茶在糖、脂代谢紊乱发挥了重要的保护作用。但其确切机制尚未阐明。对氧磷酶 3 (Paraoxonase-3, pon3)、鸢尾素在糖、脂代谢中发挥了重要作用^[4,5]。PI3K/Akt、PGC-1 α 可分别调控 Pon3、鸢尾素的表达^[6,7]。而有研究发现茶多糖、儿茶素没食子酸酯(EGCG)分别对 PI3K/Akt、PGC-1 α 的表达有影响作用^[8,9]。推测茶叶可能通过影响 PI3K/Akt、PGC-1 α 的表达,从而对 pon3、鸢尾素产生影响,进而在糖、脂代谢发挥了作用。湖北长盛川青砖茶是在古峡州茶区三峡地区特有的黑茶。本研究观察糖尿病大鼠肝脏 pon3、鸢尾素的表达及该青砖茶水提物的干预作用,从而探讨 pon3、鸢尾素在糖尿病发生中发挥的作用以及该青砖茶对糖、脂代谢影响的机制。

1 材料与方法

1.1 试药 链尿佐菌素(STZ,购自美国 Sigma 公司)。pon3、鸢尾素、PGC-1 α 、PI3K/Akt 引物由武汉博士德生物工程有限公司设计合成。一抗(购自武汉三鹰生物技术有限公司)、二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。逆转录试剂盒(购自美国 Invitrogeng 公司)。丙二醛(MDA)检测试剂盒(购自南京建成试剂公司)。IL-6 试剂盒(购自武汉赛培生物科技有限公司),青砖茶(规格:15 g,湖北长盛川青砖茶研究所)。青砖茶水提物的制备:按照 1:15 的茶水比例,将青砖茶在 100 °C 沸水中浸提 4 次,每次持续 10 min;将 4 次的提取液合并后,用脱脂棉滤过,最后将滤液冷冻干燥,得到青砖茶水提物粉末,并将其置于 4 °C 冰箱保存待用。

1.2 仪器 血糖仪(美国强生公司),C8000 全自动生化分析仪(美国雅培公司)。Cobase411 全自动电化学发光分析仪(德国罗氏公司)。weiBioTekCere 酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)。

1.3 动物 63 只雄性 SD 大鼠,体质量 180~210 g,SPF 级(购自武汉大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(鄂)2017-0012。饲养于三峡大学附属仁和医院实验动物实验中心,适应性喂养 7 d)。

1.4 分组给药与造模 将实验大鼠 63 只随机分为对照组(NC 组)20 只,实验组 43 只。对照组给予普通饲料喂养,实验组高脂饲料喂养 4 周后,STZ 40 mg·kg⁻¹ 一次性腹腔注射,72 h 后测尾静脉血糖,以 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 为造模成功。实验组有 40 只大鼠造模成功。继续高脂饲养 4 周后随机分为 2 组:

糖尿病组(DM 组)和青砖茶水提物组(T+DM 组)。T+DM 组给予青砖茶水提物 1.0 g·kg⁻¹·d⁻¹(根据体质量 60 kg 成人每日茶饮用量 10 g 为标准以及提取过程中的水浸出物百分含量换算所得,计算公式:大鼠的剂量 = 10 g × 0.018/(0.2 kg) \approx 1.0 g·kg⁻¹·d⁻¹),经口灌胃 4 周,用蒸馏水稀释。另外 2 组每日给予等体积蒸馏水经口灌胃。

1.5 标本采集 第 12 周末禁食 12 h,戊巴比妥麻醉,腹主动脉取血,-80 °C 保存备用。采血后立即取出大鼠肝脏组织,标记后放于-80 °C 冰箱保存。

1.6 RT-PCR 检测大鼠肝脏组织 pon3 鸢尾素 PGC-1 α PI3K/Akt 核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度,取等量 RNA 逆转录得到 cDNA。取适量 cDNA 进行扩增。引物序列:pon3 上游引物 5'-CTCGTC-CACCTGAAAACCAT -3',下游引物 5'-GAAGTCCAGTGAGGGTCCAA -3'。鸢尾素上游引物:5'-GATCATCGTCGTGGTCTCTT -3',下游引物 5'-ATGCACTCTTGGTTTTTTCCTT -3'。PGC-1 α 上游引物 5'-AAGGTCCCCAGGCAG-TAGAT -3',下游引物 5'-TTCAGACTCCCGCT-TCTCAT -3'。PI3K 上游引物 5'-GCAA-CAAGTCTCTGCCAAA -3',下游引物 5'-ACG-TAATAGAGGAGCTGGGC -3'。Akt 上游引物 5'-GCTCTTCTTCCACCTGTCTCG -3',下游引物 5'-CACAGCCCCGAAGTCCGTTA -3'。用 Trizol 提取肝脏组织中总 RNA(按 Trizol 说明书操作)。按试剂盒方法(SYBR[®] Premix Ex Taq[™], Takara)进行 RT-PCR,分别检测肝脏组织中 pon3、鸢尾素、PGC-1 α 、PI3K/Akt mRNA。RT-PCR 反应条件:预变性 95 °C 10 min,变性 95 °C 10 s。退火 58 °C 15 s,延伸 72 °C 20 s,40 个循环。

1.7 Western blot 测定 pon3 鸢尾素 PGC-1 α PI3K/Akt 蛋白水平 从肝脏组织中提取总蛋白质,用含有 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 的溶解缓冲液中 1% NP-40,150 mmol·L⁻¹ NaCl,0.1% SDS,1 mmol·L⁻¹ PMSF,1 mmol·L⁻¹ Na₃VO₄ 的裂解液提取。以牛血清白蛋白为标准,用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度。

将等量的蛋白质(50 μ g)加入 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,并转移到 PVDF 膜。用抗体 GAPDH 作为内部对照,对膜进行检测。用增强化学发光(ECL)检测系统显示辣根过氧化物酶偶联抗体产生的信号,在柯达 X 胶片上曝光。用 bandscan 4.3 软件进行密度分析,确定蛋白质水平作为频带强度的

集成区域(像素)。蛋白质带强度的数值随 GAPDH 带的值进行校正。

1.8 统计学方法 统计学检验采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组相关代谢指标的比较 DM 组、T+DM 组 FPG、FIns、TG、TC、HOMA-IR、IL-6、MDA 较 NC 组高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), T+DM 组上述指标和 TC 较 DM 组低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

2.2 各组肝脏组织 pon3 鸢尾素 PI3K/Akt PGC-1 α 的表达结果 肝脏 pon3、鸢尾素、PI3K/Akt、PGC-1 α 的表达水平依次为 NC 组、T+DM 组、DM 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

本文发现青砖茶水提物组大鼠 FPG、FIns、TG、TC、HOMA-IR 明显下降,说明青砖茶水提物对胰岛素抵抗、糖脂代谢发挥了重要作用。研究证实 pon3 与胰岛素抵抗关系密切^[4], pon3 可能在 2 型糖尿病及其并发症的发生中发挥了保护作用^[10,11]。我们前期研究发现糖尿病大鼠脂肪组织 pon3 表达下降,低水平的 pon3 参与了糖尿病的发生^[12]。本研究发现糖尿病大鼠肝脏组织 pon3 的表达降低,进一步证实低水平的 pon3 参与了胰岛素抵抗、糖尿病的发生。新近研究发现 PI3K/Akt 能上调 pon3 的表达^[6]。我

们前期研究也发现上调 PI3K/Akt 能增加糖尿病大鼠脂肪组织 pon3 的表达^[12]。PI3K/Akt 是胰岛素发挥生理作用的主要通路,参与胰岛素对葡萄糖代谢的调控。研究证实茶多糖能上调糖尿病大鼠肝脏 PI3K/Akt 的表达从而改善胰岛素抵抗^[8]。本研究也发现长盛川青砖茶组肝脏 PI3K/Akt 的表达较糖尿病组增加,同时伴有 pon3 表达增加。青砖茶水提物可能通过上调 PI3K/Akt 的表达,从而对 pon3 的表达产生了影响。本研究发现给予长盛川青砖茶灌胃后 pon3 的表达增加,胰岛素抵抗、糖代谢改善。可能长盛川青砖茶改善胰岛素抵抗、糖代谢部分通过上调 pon3 的表达完成。

鸢尾素是新近发现的一种细胞因子,与糖、脂代谢相关^[5]。鸢尾素能通过增加 AMPK 的磷酸化调控葡萄糖摄取从而改善胰岛素抵抗^[13]。已证实,低水平的鸢尾素参与了胰岛素抵抗的发生^[14]。而本研究发现糖尿病大鼠肝脏鸢尾素表达降低。这也进一步证实低水平的鸢尾素参与了胰岛素抵抗、糖尿病的发生。鸢尾素受 PGC-1 α 的调控,PGC-1 α 对鸢尾素的分泌发挥了重要的促进作用^[7]。实验发现茶叶中的 EGCG 能增加 PGC-1 α 的表达^[9]。而本研究发现,给予青砖茶水提物灌胃后 PGC-1 α 的表达增加,同时鸢尾素的表达亦增加。提示青砖茶水提物可能通过上调 PGC-1 α 的表达而影响了鸢尾素的表达。本研究发现给予青砖茶水提物灌胃后鸢尾素的表达增加,胰岛素抵抗、糖代谢改善。可能青砖茶水提物改善胰岛素抵抗、糖代谢部分依赖上调鸢尾素的表达完成。

表 1 各组大鼠相关代谢指标的比较($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	FPG/ mmol·L ⁻¹	Fins/ mmol·L ⁻¹	IL-6/ pg·ml ⁻¹	MDA/ nmol·ml ⁻¹	TC/ mmol·L ⁻¹	TG/ mmol·L ⁻¹	HDL/ mmol·L ⁻¹	LDL-C/ mmol·L ⁻¹	HOMA-IR
	NC	4.77±1.09	10.24±1.13	29.13±10.24	1.50±0.33	1.48±0.20	0.53±0.35	0.88±0.85	
DM	18.89±5.79	18.63±1.78 ^c	40.62±10.98 ^c	2.73±0.38 ^c	1.76±0.28 ^b	0.81±0.25 ^c	0.72±0.65 ^b	0.61±0.31 ^b	6.78±0.46 ^c
T+DM	8.97±0.98	14.56±1.27 ^{bf}	34.23±10.96 ^{bf}	2.37±0.36 ^{bf}	1.51±0.23 ^f	0.64±0.27 ^{fb}	0.75±0.79 ^b	0.58±0.26 ^b	4.12±0.37 ^{bg}

注:与 NC 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 DM 比较,^f $P < 0.05$,^g $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠肝脏组织 pon3 鸢尾素 PI3K/Akt PGC-1 α 的 mRNA 及蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	Pon3	鸢尾素	PI3K	AKT	PGC1 α	mRNA				
						Pon3	鸢尾素	PI3K	AKT	PGC1 α
NC	0.677±0.124	0.735±0.143	0.785±0.271	0.724±0.181	0.89±0.139	1.061±0.132	1.047±0.264	1.102±0.331	1.071±0.511	1.015±0.211
DM	0.385±0.087 ^c	0.396±0.103 ^c	0.343±0.198 ^c	0.315±0.178 ^c	0.41±0.127 ^c	0.571±0.125 ^c	0.521±0.213 ^c	0.512±0.178 ^c	0.432±0.211 ^c	0.327±0.123 ^c
T+DM	0.513±0.104 ^{bf}	0.578±0.107 ^{bf}	0.586±0.214 ^{bf}	0.562±0.179 ^{bf}	0.63±0.152 ^{bf}	0.723±0.118 ^{bf}	0.712±0.212 ^{bf}	0.752±0.125 ^{bf}	0.723±0.256 ^{bf}	0.647±0.178 ^{bf}

注:与 NC 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 DM 组比较,^f $P < 0.05$ 。

本研究发现糖尿病大鼠肝脏 pon3、鸢尾素表达降低。低水平的 pon3、鸢尾素对炎症因子的抑制作用减弱可能参与了本研究中糖尿病大鼠 IL-6 水平增加。实验发现黑茶可抑制高脂饲养大鼠炎症因子的作用^[3,15]。本研究发现青砖茶水提物治疗组 pon3、鸢尾素表达较糖尿病组增加, IL-6 水平下降。认为青砖茶水提物的抗炎作用部分通过上调 pon3、鸢尾素的表达完成。

本研究发现,青砖茶水提物组 pon3、鸢尾素表达较糖尿病组增加, MDA 水平下降。认为青砖茶水提物的抗氧化应激作用部分依赖于其上调 pon3、鸢尾素的表达。青砖茶通过增加 pon3、鸢尾素的表达抑制炎症、氧化应激是其改善胰岛素抵抗、糖代谢的重要机制。

我们前期临床研究也发现鸢尾素与血脂有显著相关性^[13]。这些提示 pon3、鸢尾素与脂质代谢密切相关。我们认为,本研究中 pon3、鸢尾素的表达降低参与了脂质代谢紊乱。本研究发现给予青砖茶水提物灌胃后 pon3、鸢尾素的表达增加,脂质代谢改善。青砖茶水提物通过对 pon3、鸢尾素的影响可能是其改善脂代谢的机制之一。其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Manikandan R, Sundaram R, Thiagarajan R, *et al.* Effect of black tea on histological and immunohistochemical changes in pancreatic tissues of normal and streptozotocin-induced diabetic mice (*Mus musculus*)^[J]. *Microsc Res Tech*, 2009, 72(10): 723-726
- [2] Cheng Q, Cai S, Ni D, *et al.* In vitro antioxidant and pancreatic α -amylase inhibitory activity of isolated fractions from water extract of Qingzhuan tea^[J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(2): 928-935
- [3] Bitzer ZT, Elias RJ, Vijay-Kumar M, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate decreases colonic inflammation and permeability in a mouse model of colitis, but reduces macronutrient digestion and exacerbates weight loss^[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(10): 2267-2274
- [4] Rull A, García R, Fernández-Sender L, *et al.* Serum paraoxonase-3 concentration is associated with insulin sensitivity in

peripheral artery disease and with inflammation in coronary artery disease^[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 22(2): 545-551

- [5] Xiong XQ, Chen D, Sun HJ, *et al.* FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity^[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9): 1867-1875
- [6] Zhu L, Shen Y, Sun W. Paraoxonase 3 promotes cell proliferation and metastasis by PI3K/Akt in oral squamous cell carcinoma^[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(85): 712-717
- [7] Wrann CD, White JP, Salogiannis J, *et al.* Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway^[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 649-655
- [8] Li S, Chen H, Wang J, *et al.* Involvement of the PI3K/Akt signal pathway in the hypoglycemic effects of tea polysaccharides on diabetic mice^[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015(81): 967-974
- [9] Lee MS, Lee S, Doo M, *et al.* Green Tea (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Induces PGC-1 α Gene Expression in HepG2 Cells and 3T3-L1 Adipocytes^[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2016, 21(1): 62-67
- [10] 刘云涛, 简磊, 李建伟, 等. 新诊断 2 型糖尿病患者血清对氧磷酶 3 水平与颈动脉粥样硬化的相关性^[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(1): 47-50
- [11] 刘云涛, 简磊, 李建伟. 阿托伐他汀对 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化患者血清对氧磷酶 3 影响的临床观察^[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(11): 979-983
- [12] 刘云涛, 董国锋, 潘敬芳. 对氧磷酶 3 在糖尿病大鼠脂肪组织的表达及二甲双胍的干预^[J]. *解放军药学报*, 2017, 33(6): 533-535
- [13] 刘云涛, 简磊, 潘敬芳. 血清鸢尾素与 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化的相关性^[J]. *上海医学*, 2017, 40(8): 470-474
- [13] Lee HJ, Lee JO, Kim N, *et al.* Irisin, a novel myokine, regulates glucose uptake in skeletal muscle cells via AMPK^[J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(6): 873-881
- [14] Yang Z, Chen X, Chen Y, *et al.* Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice^[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6490-6497
- [15] Heber D, Zhang Y, Yang J, *et al.* Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets^[J]. *J Nutr*, 2014, 144(9): 1385-1393

(收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-05-04)

(本文编辑 魏萍)