

橄榄苦苷对奥氮平诱导肝脏糖代谢紊乱的调节及 AKT、FOXO1 信号通路的影响

文亚妮 钟印 唐泰龙 谢智勇 陈琳*
(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的 探讨橄榄苦苷对奥氮平诱导肝脏糖代谢紊乱的调节及 AKT、FOXO1 信号通路的影响。方法 挑选雌性 KM 小鼠 50 只, 随机数字表法分成正常对照组、模型组、橄榄苦苷高剂量组、橄榄苦苷中剂量组、橄榄苦苷低剂量组, 每组各 10 只。予以橄榄苦苷高、中、低剂量组分别为 0.05g/(kg·d)、0.035g/(kg·d)、0.025g/(kg·d), 模型组小鼠给予同等量生理盐水。正常对照组不需特殊处理, 持续灌胃 12 周, 每日记录体重, 实验结束后处死小鼠, 收集肝脏组织供检测肝脏糖代谢和基因/蛋白表达用。检测小鼠肝脏糖代谢指标及 AKT 和 FOXO1 蛋白表达。结果 与正常组相比, 模型组小鼠肝脏 p-EPCK、G-6-P、GSK-3 均升高, 肝糖原降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。与模型组相比, 橄榄苦苷低、中、高剂量组小鼠肝脏 p-EPCK、GSK-3、G-6-P 均降低, 糖原升高 (P<0.05); 小鼠肝脏组织 Western blot 检测结果所示, 与正常组相比, 模型组小鼠肝脏的 AKT 和 FOXO1 表达显著降低; 与模型组比较, 橄榄苦苷低、中、高剂量组肝脏中 FOXO1 蛋白表达升高差异具有统计学意义 (P<0.05); 而高剂量组的蛋白表达结果优于低剂量组。结论 奥氮平可造成的肝脏糖代谢紊乱, 机制可能与其抑制调控因子 Akt-FoxO1 的磷酸化, 促进 p-EPCK, G-6-P 转录, 介导胰岛素抵抗和促进糖异生有关。
关键词: 橄榄苦苷; 奥氮平; 肝脏糖代谢; AKT、FOXO1 信号通路

橄榄苦苷(Oleuropein), 是一种无毒的裂环烯醚萜苷类化合物。裂环烯醚萜 (secoiridoids) 是环戊烷单萜衍生物中的一类化合物, 是由环烯醚萜类化合物裂环而成, 只占环烯醚萜类的很少一部分^[1]。研究表明, 奥氮平作为第二代抗精神病药物的代表, 能够引起肥胖和胰岛素抵抗为主的糖代谢紊乱, 其在有效地控制精神分裂症的病理性症状的同时, 也存在明显的代谢紊乱不良反应而阻碍了使用, 在治疗过程中细胞因子的变化是否与药物副作用有直接相关, 目前尚无明确的结论。

肝脏是主要的胰岛素靶器官, 在维持葡萄糖稳态中具有重要地位, 而 AKT、FOXO1 信号通路是体内重要的细胞信号通路^[2]。本文基于对橄榄苦苷的认识, 选择奥氮平诱导的代谢紊乱小鼠模型, 进一步探查橄榄苦苷对该模型小鼠的调节机制及 AKT、FOXO1 信号通路的影响。

1 动物与方法

1.1 实验动物及主要材料

挑选雌性 KM 小鼠 50 只, 清洁级, 8 周龄, 体重 20~22 g, 小鼠饲养于长沙医学院动物实验室。温度 22~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 日夜交替照明。本研究项目中动物实验方案经长沙医学院实验动物使用与管理委员会审核批准。奥氮平, 血糖仪、血糖试纸, ELISA 试剂盒, SDS-PAGE 蛋白缓冲液。

1.2 方法

1.2.1 奥氮平诱导建立小鼠肝脏糖代谢紊乱模型

雌性 KM 小鼠 40 只, 于长沙医学院实验动物中心适应性饲养 1 周后, 按 5mg/(kg·d) 对小鼠进行奥氮平溶液灌胃处理, 每天 1 次, 持续 6 周, 建立小鼠肝脏糖代谢紊乱模型。

1.2.2 分组及给药

建模成功后, 采用随机数字表法将 40 只小鼠分成 4 组: 模型组、橄榄苦苷高剂量组 (橄高组)、橄榄苦苷中剂量组 (橄中组)、橄榄苦苷低剂量组 (橄低组), 每组各 10 只。予以橄榄苦苷高、中、低剂量组分别为 0.05g/(kg·d)、0.035g/(kg·d)、0.025g/(kg·d), 模型组小鼠给予同等量生理盐水。正常对照组不需特殊处理, 持续灌胃 12 周, 每日记录体重, 实验结束后处死小鼠, 收集肝脏组织供检测肝脏糖代谢和基因/蛋白表达用。

1.3 检测指标

1.3.1 肝脏糖代谢指标检测

ELISA 法检测 p-EPCK、G-6-P、GSK-3、糖原, 相关操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.3.2 AKT 和 FOXO1 蛋白检测

Western blot 检测 AKT 和 FOXO1 蛋白, 检测方式参考宋杰^[3]等步骤进行。

1.4 统计分析

所有数据均采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 橄榄苦苷对奥氮平诱导肝脏糖代谢相关指标的影响

与正常组相比, 模型组小鼠肝脏 p-EPCK、G-6-P、GSK-3 均升高, 肝糖原降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。与模型组相比, 橄榄苦苷低、中、高剂量组小鼠肝脏 p-EPCK、GSK-3、G-6-P 均降低, 糖原升高 (P<0.05)。具体详见表 1。

表 1 各组小鼠肝脏糖代谢相关指标的比较 (x ± s)

组别	例数	糖原(mg/g)	GSK-3(U/mL)	G-6-P(U/mL)	p-EPCK(U/mL)
对照组	10	1.04 ± 0.27	0.18 ± 0.05	0.99 ± 0.22	0.384 ± 0.074
模型组	10	0.58 ± 0.26	0.27 ± 0.04	1.37 ± 0.62	0.601 ± 0.171
橄高组	10	0.91 ± 0.20	0.21 ± 0.02	1.05 ± 0.28	0.411 ± 0.068
橄中组	10	0.83 ± 0.23	0.21 ± 0.04	1.10 ± 0.23	0.435 ± 0.094
橄低组	10	0.79 ± 0.25	0.21 ± 0.05	1.25 ± 0.19	0.451 ± 0.113

2.2 橄榄苦苷对奥氮平诱导小鼠肝脏 AKT 和 FOXO1 蛋白表达情况

小鼠肝脏组织 Western blot 检测结果所示, 与正常组相比, 模型组小鼠肝脏的 AKT 和 FOXO1 表达显著降低; 与模型组比较, 橄榄苦苷低、中、高剂量组肝脏中 FOXO1 蛋白表达升高差异具有统计学意义 (P<0.05); 而高剂量组的蛋白表达结果优于低剂量组。具体见图 1。

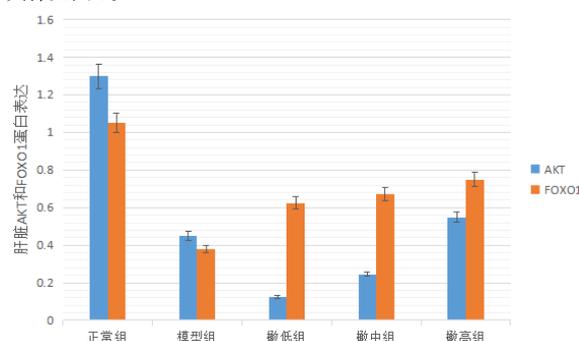


图 1 各组小鼠肝脏 FOXO1、AKT 的表达比较

(下转第 241 页)

(上接第 82 页)

3 讨论

橄榄苦苷是一种无毒的多酚类裂环烯醚萜苷类化合物^[1],具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、解毒、降血糖、降血压、降血脂、器官保护等多种药理作用^[2]。在候丹等^[6]研究发现经过橄榄苦苷治疗后,小鼠空腹血糖、胰岛素抵抗显著改善,肝脏 Akt, FoxO1 磷酸化显著提高;说明橄榄苦苷通过调节调控因子 Akt-FoxO1 信号转导,下调 p-EPCK,G-6-P 转录,抑制糖异生,降低血糖水平。此外, Akt, FoxO1 蛋白是胰岛素信号转导通路中的蛋白酶,在调节糖异生中发挥重要作用。生理情况下,胰岛素可引起 Akt 的磷酸化,并激活下游 FoxO1 发生磷酸化,使胞核排出到胞质而失去活性,进而影响糖异生,降低了血糖水平^[7]。本实验发现,橄榄苦苷干预组 Akt、FoxO1 磷酸化较于奥氮平显著提升。

张宏^[8]等研究检测到肝脏组织胰岛素信号通路的重要蛋白 Akt 的磷酸水平显著降低,结果证实奥氮平的长期给药导致的糖代谢异常部分由肝脏组织的胰岛素抵抗所介导。FoxO1 是位于 p-EPCK,G-6-P 上游的调控因子,在转录水平调节二者的表达,同时是胰岛素信号转导过程中 Akt 下游的靶蛋白,可调节糖异生关键酶^[9]。而 p-EPCK, G-6-P 在肝糖代谢调节发挥关键作用, p-EPCK 是糖异生第一步反应的催化酶, G-6-P 则是糖异生和糖原分解最后一步的调节酶^[10]。但在正常情况下,胰岛素刺激一系列级联反应引起 Akt 磷酸化,激活下游 FoxO1 发生磷酸化,从而由胞核排出到胞质失去活性,不能刺激下游 p-EPCK,G-6-P 转录,进而抑制糖异生,降低血糖水平^[11]。本文结果表明,与正常组相比,模型组小鼠肝脏的 AKT 和 FOXO1 表达显著降低;与模型组比较,橄榄苦苷低、中、高剂量组肝脏中 FOXO1 蛋白表达升高差异具有统计学意义 (P<0.05);而高剂量组的蛋白表达结果优于低剂量组。

综上所述,奥氮平可造成的肝脏糖代谢紊乱,机制可能与其抑制调控因子 Akt-FoxO1 的磷酸化,促进 p-EPCK, G-6-P 转录,介导胰岛素抵抗和促进糖异生有关。此外,肝脏中胰岛素信号的传导与 AKT、FOXO1 通路相关蛋白的表达有关,在葡萄糖转运、糖原合成、糖酵解和糖异生的调节等方面发挥一定的作用。

参考文献:

[1]Aziz NH, Farag SE,Monsa LA,et al.Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds[J].Microbios,1998,93(374): 43-54.

[2]王月秋,王丽宏,车慧等.微小 RNA 与胰岛素 PI3K/AKT 信号转导通路[J].新医学,2017,48(07):438-442.

[3]宋杰,何涛,谢华福等.乳小鼠培养肝细胞蛋白质双向电泳技术的建立[J].泸州医学院学报,2004(04):285-288.

[4]LIU M, YONG Q, YU S.Efficient bioconversion of oleuropein from olive leaf extract to antioxidant hydroxytyrosol by enzymatic hydrolysis and high-temperature degradation[J].Biotechnol Appl Biochem, 2018, 65(5):680-689.

[5]郑洁,魏鉴腾,刘建飞,等.油橄榄叶提取物生物活性研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(4):613-618.

[6]候丹,刘铜华.橄榄苦苷对糖尿病小鼠肝脏糖代谢的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):134-139.

[7]WANG S, CHEN X, NAIR S, et al. Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B obliterates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial dysfunction through regulation of autophagy[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(12): 3060-3074.

[8]张宏,龙彬,钱昀,孙锦华,杜亚松.奥氮平对糖代谢的影响及其机制探讨[J].精神医学杂志,2013,26(05):348-350.

[9]LIU Q,ZHANG F G,ZHANG W S,et al. Ginsenoside Rg1 inhibits glucagon-induced hepatic gluconeogenesis through Akt-FoxO1 interaction[J].Theran-ostics, 2017,7(16):4001-4012.

[10]NA R S,MA C,LIU Q R,et al. Itraconazole attenuates hepatic gluconeogenesis and promotes glucose uptake by regulating AMPK pathway[J]. Exp Ther Med, 2018,15(2):2165-2171.

[11]SHI Y, QIAO J,MU B,et al.3-(2-amino-ethyl)-5-[3-(4-butoxy-phenyl)-propylidene]-thiazolidine-2,4-dione (K145) ameliorated dexamethasone induced hepatic gluconeogenesis through activation of Akt/FoxO1 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017,493(1):286-290.

基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目:湘教通[2020]191号-3922;

第一作者:文亚妮,(2002.06-),女,汉族,湖南,本科,临床医学;

*通讯作者:陈琳,(1982.10-),女,汉,湖南益阳,硕士,副教授,研究方向:精神医学、儿童青少年心理卫生保健。