

基础研究

白藜芦醇调节 C57BL/KSJ-db/db 糖尿病小鼠糖脂代谢的作用与机制

吕秀萍

海南省人民医院药学部,海南 海口 570311

摘要:目的 研究白藜芦醇对 C57BL/KSJ-db/db (db/db)糖尿病小鼠糖脂代谢的作用与机制。方法 随机将 db/db 糖尿病小鼠分为模型组、白藜芦醇组(200 mg/kg)和吡格列酮组(5 mg/kg),每组 8 只,给予相应的药物治疗 8 周。实验结束后比较各组空腹血糖、糖化血清蛋白、糖化血红蛋白、血清总胆固醇、甘油三酯等糖脂代谢指标,比较各组血清胰岛素浓度及胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感指数、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量等指标的变化。采用 Real-time PCR 技术和 Western blot 检查肝脏组织中低密度脂蛋白受体基因和蛋白的表达。结果 与模型组比较,白藜芦醇组能显著降低小鼠空腹血糖、糖化血清蛋白、糖化血红蛋白、血清总胆固醇、甘油三酯等指标的升高($P<0.05$),明显改善血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感指数、超氧化物歧化酶活性、丙二醛等指标的异常($P<0.05$);显著提高肝脏中肝糖原含量和低密度脂蛋白受体的表达($P<0.05$)。结论 白藜芦醇具有明显改善糖脂代谢紊乱的作用,其作用机制与其改善胰岛素抵抗、提高抗氧化应激能力以及增加低密度脂蛋白受体的表达等密切相关。

关键词:白藜芦醇;2型糖尿病;胰岛素抵抗;氧化应激;低密度脂蛋白受体

糖尿病合并高脂血症是糖尿病慢性血管并发症的基础病变,而糖尿病慢性血管并发症是糖尿病导致死亡率及致残率升高的主要原因^[1]。有效治疗 2 型糖尿病和控制并发症是新药研发领域的热点和重点。白藜芦醇是一种天然的抗氧化剂,可降低血液粘稠度,抑制血小板凝结和血管舒张,保持血液畅通,可预防癌症的发生及发展,具有抗动脉粥样硬化和冠心病、缺血性心脏病、高血脂的防治作用^[2]。本研究探讨白藜芦醇对 db/db 糖尿病小鼠糖脂代谢的影响及其可能的作用机制,为白藜芦醇在治疗糖尿病的临床运用提供充足的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/KsJ- db/db 糖尿病小鼠(db/db),SPF 级,24 只,周龄五周(35~40 mg),由南京大学模式动物中心提供,实验在 SPF 级实验室进行,动物室内温度 20~25 ℃、相对湿度 40%~70%、换气次数 10~15 次/h。白藜芦醇(纯度 95.1%,HPLC)购自陕西赛得高科生物股份有限公司。

1.2 试剂

空腹血糖(FBG)、血清总胆固醇(TC)、血清甘油三酯(TG)、糖化血清蛋白(GSP)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、超氧化物歧化酶(SOD)、微量丙二醛(MDA)、肝糖原等测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;小鼠胰岛素(INS)酶联免疫检测试剂盒:美国 RD;浓硫酸(AR):广州化学

试剂厂。LDLR 兔单抗:Proteintech;LDLR 引物:上海生工生物有限公司。

1.3 方法见文献[3]

1.3.1 糖脂代谢指标的检测 FBG、TG、TC 使用酶法由 Beck-manCX-5 全自动生化分析仪进行检测;GSP、HbA_{1c}分别用果糖胺法、比色法进行检测。

1.3.2 血清胰岛素浓度的检测 采用双抗体夹心 ELISA,测定小鼠血清中胰岛素的浓度,并按公式计算血清胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)与血清胰岛素敏感指数(ISI)^[4-5]:

胰岛素抵抗指数:HOMA-IR=FBG×INS/22.51

胰岛素敏感性指数:ISI=Ln(1/(INS×FBG))

FBG:空腹血糖浓度 mmol/L; INS:空腹胰岛素浓度 U/ml。

1.3.3 血清 SOD、MDA 检测 用 WST-1 法检测血清 SOD 活性;用硫代巴比妥酸法(TBA)检测血清 MDA 含量。

1.3.4 肝糖原含量的检测 切取保存于-80 ℃冰箱的肝脏组织块,用生理盐水漂洗后,滤纸吸干,称重,约 75 mg,按重量体积比 1:3 加入相应体积的碱溶液,沸水浴煮 20 min,流水冷却,使其组织块完全破碎。加入蒸馏水制成 1%的肝糖原检测液(一般可见检测液上层漂浮有乳白色油状物),加入一定量的氯仿,漩涡混匀,4000 r/min 离心 10 min,取上清液用于检测。上清液与显色液混匀后煮沸 5 min,冷却后于 620 nm,1 cm 光径,空白管调零,测各管 D 值,并以 0.01 mg/ml 标准葡萄糖应用液为基准对照,计算肝脏组织中糖原含量。

收稿日期:2014-07-19

作者简介:吕秀萍,主管药师,E-mail: xiuping6011@163.com

1.3.5 Real-time PCR 方法检测低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的基因表达 实时定量 PCR 采用 BioRad iCycler Iq 系统进行扩增。PCR 反应液组分(25 μ l 反应体系)包括: 12.5 μ l SYBR Premix Ex Taq™ (2 \times) (TaKaRa), 2 μ l cDNA, 各 0.5 μ l (5 pmol) 上游引物和下游引物, 以及 9.5 μ l 灭菌蒸馏水。每个样本平行做 3 个。采用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 实验中所用到的引物: LDLR (forward 5'-ACCGAGACCA AACTCATTCA-3', reverse 5'-TAGGTGGGCGGACA TAAAG-3'), 内参 GAPDH (forward 5'-AGGAGTAAG AAACCCTGGAC-3', reverse 5'-CTGGGATGGAATT GTGAG-3')。各样本目的基因的 CT 值减去内参 GAPDH 的 CT 值, 得到 Δ CT 值。再用各处理组的 Δ CT 值减去空白对照组值, 得到 $\Delta\Delta$ CT 值。最后采用方程

$2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算本目的基因的相对表达水平。

1.3.6 Western blot 检测低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的蛋白表达见文献[6]

1.4 统计学分析

实验数据结果以均数 \pm 标准差表示, 用 SPSS 11.6 统计软件分析比较。多组比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 糖脂代谢指标的变化

与模型组相比, 白藜芦醇组和吡格列酮组均能显著降低小鼠 FBG、HbA_{1c} 及 GSP 的含量 ($P < 0.05$); 并能显著降低小鼠血清中 TC、TG 水平 (表 1, $P < 0.05$)。提示白藜芦醇降低血糖的同时对血脂具有明显的调理作用。

表 1 给药治疗后空腹血糖值、糖化血红蛋白、糖化血清蛋白、血清总胆固醇和甘油三酯含量的变化

Tab.1 Fasting blood glucose, glycosylated serum protein and glycosylated hemoglobin content, serum total cholesterol, triglycerides of db/db mice after 8 weeks of resveratrol treatment (Mean \pm SD, n=8)

Group	FBG mmol·L ⁻¹	GSP μ mol·L ⁻¹	HbA _{1c} OD·10g ⁻¹	TC mmol·L ⁻¹	TG mmol·L ⁻¹
db/db	26.4 \pm 1.02	2.94 \pm 0.29	41.86 \pm 4.03	3.31 \pm 0.35	2.49 \pm 0.43
Resveratrol	17.9 \pm 3.55 [#]	1.93 \pm 0.18 [#]	30.07 \pm 3.52 [#]	2.43 \pm 0.28 [#]	1.41 \pm 0.25 [#]
Pioglitazone	18.65 \pm 3.26 [#]	2.01 \pm 0.21 [#]	32.96 \pm 3.06 [#]	2.10 \pm 0.48 [#]	1.27 \pm 0.39 [#]

FBG: Fasting blood glucose, GSP: glycosylated serum protein, HbA_{1c}: glycosylated hemoglobin, TC: serum total cholesterol, TG: triglycerides, [#] $P < 0.05$ vs model.

2.2 血清胰岛素浓度的变化

给药组与模型组比较, 血清胰岛素的浓度明显降低 ($P < 0.05$), 胰岛素抵抗指数显著减小 (表 2, $P < 0.05$), 同时胰岛素敏感指数也有显著的升高 ($P < 0.05$)。提示白藜芦醇能显著改善胰岛素抵抗从而降低血清胰岛素的浓度。

表 2 给药治疗后血清胰岛素浓度, 胰岛素抵抗指数和胰岛素敏感指数的变化

Tab.2 Plasma insulin and insulin resistance of db/db mice after 8 weeks of resveratrol treatment (Mean \pm SD, n=8)

Group	INS /mIU·L ⁻¹	HOMA-IR/ μ mol·L ⁻¹	ISI
db/db	18.23 \pm 1.42	21.38 \pm 2.31	-6.17 \pm 0.16
Resveratrol	11.87 \pm 2.04 [#]	9.44 \pm 1.84 [#]	-5.36 \pm 0.18 [#]
Pioglitazone	8.63 \pm 1.42 [#]	7.15 \pm 2.35 [#]	-5.08 \pm 0.32 [#]

Data are represented as Mean \pm SD, INS: insulin, HOMA-IR: insulin resistance index, ISI: insulin sensitivity index, [#] $P < 0.05$ vs model.

2.3 血清 SOD 活性和 MDA 含量的变化

白藜芦醇组和吡格列酮组与模型组比较, 血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性明显增加 ($P < 0.05$), 脂质过氧化物代谢产物丙二醛 (MDA) 的含量显著减少 ($P <$

0.05)。

2.4 肝糖原含量变化

白藜芦醇组和吡格列酮组与模型组比较, 肝糖原含量显著增加 ($P < 0.05$), 表明白藜芦醇可显著提高肝糖原的含量。

2.5 对 LDLR 基因、蛋白表达的影响

白藜芦醇组和吡格列酮组与模型组比较, LDLR 的 mRNA 和蛋白表达显著增加 (图 1, $P < 0.05$) 提示白藜芦醇可能通过上调 LDLR 的表达参与脂代谢的调节。

3 讨论

C57BL/KSJ-db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的自发性 2 型糖尿病小鼠, 在早期四周龄即出现显著糖尿病症状, 具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特征, 其发病过程与人的 2 型糖尿病非常相似^[7-8]。db/db 糖尿病小鼠是国际公认的 2 型糖尿病动物模型, 是目前广泛用于糖尿病发病机制及并发症方面研究, 因此本实验研究采用 db/db 糖尿病小鼠作为实验研究对象。

糖、脂代谢紊乱是糖尿病并发症发生的一个重要因素^[1]。肝脏是体内进行糖代谢的重要器官, 肝脏可通过糖原合成和糖酵解两条途径起到代谢血糖的作用, 可以

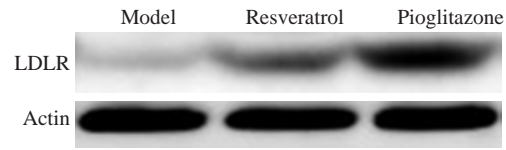
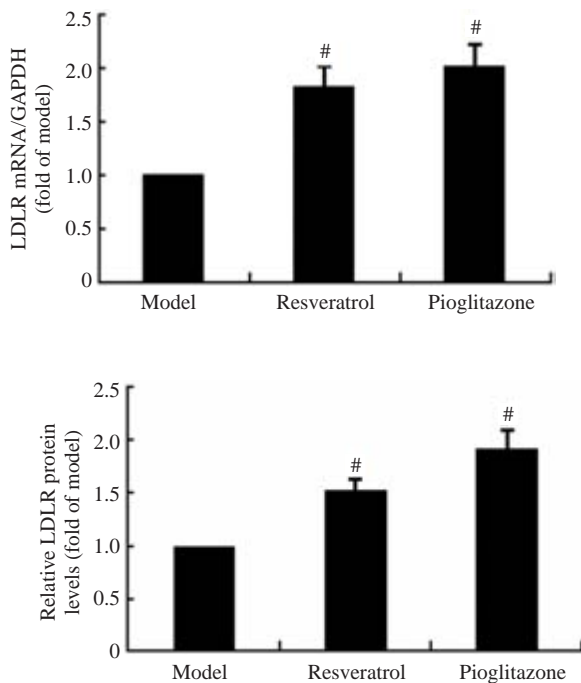


图1 糖脉交泰对肝脏低密度脂蛋白受体基因和蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of resveratrol on mRNA and protein levels of LDLR in the liver (Mean±SD, n=8) [#]P<0.05 vs model.

清除 1/3 以上的由肠道吸收的葡萄糖,在血糖调控中起着重要的作用。肝糖原合成增多,有利于减少肝糖原的输出,达到降低血糖的目的。肝脏代谢血糖能力降低,便会诱发高血糖^[9]。在 1 型和 2 型糖尿病,因为胰岛素的绝对或相对不足而导致的肝糖生成过度以及糖原合成的减少,是空腹和餐后血糖升高的一个主要原因^[10]。在糖尿病的临床治疗中,除了严格控制血糖以外还应积极采取综合措施纠正脂代谢紊乱,以防止及延缓糖尿病慢性并发症的发生与发展^[11]。血浆中胆固醇主要存在于低密度脂蛋白中,而 75% 的低密度脂蛋白胆固醇是依赖肝细胞的 LDLR 途径清除^[12-13]。最近的研究表明,LDLR 表达低下是引起高脂血症、冠心病及动脉粥样硬化的主要原因之一^[14],上调肝脏 LDLR 的表达是降低血液胆固醇水平的最主要策略。LDLR 在脂蛋白代谢中发挥重要作用,主要功能是通过摄取胆固醇进入细胞内,调节体内胆固醇平衡。LDLR 对调节体内胆固醇平衡,调节血浆总胆固醇含量起着关键作用^[12-13]。结果显示,白藜芦醇增加肝糖原合成,促进机体能量物质储存,亦能促进血糖利用,对防止体内多器官并发症发生起重要作用。模型组肝脏 LDLR 的 mRNA 和蛋白表达明显减少,而白藜芦醇可明显升高其 mRNA 和蛋白表达。提示模型动物肝脏组织对 TC、LDL-C 等清除能力减弱,机体脂代谢异常,白藜芦醇可显著增加 LDLR 的表达,从而保证了有较多的 LDLR 与低密度脂蛋白胆固醇结合,起到调节脂代谢异常的作用。

临床数据显示:有 80%~90% 的 2 型糖尿病患者都存在胰岛素抵抗,而且胰岛素抵抗也是引起高血脂、高

血压和肥胖等心血管疾病的共同致病根源^[15]。胰岛素抵抗是多种代谢相关疾病的共同病理基础及共同的危险因素,已成为 2 型糖尿病发病的中心环节,是众多疾病共同的病理生理基础,给机体带来严重危害。增加胰岛素的敏感性、改善胰岛素抵抗对于代谢综合症的防治具有非常重要的意义。

自由基引发和介导的机体氧化损伤和机体抗氧化防御系统清除自由基能力的平衡失调与糖尿病的发生、发展和病情程度密切相关^[16-19]。氧化应激是糖尿病并发症发作的上游因子,改善糖尿病患者氧化应激水平能帮助控制糖尿病并发症的发生^[16]。MDA 是脂质过氧化反应的产物,其含量可反映组织损伤的程度。SOD 是体内主要的抗氧化酶,可清除体内超氧化阴离子自由基,进而阻断由其介导的过氧化作用,保护胰岛 β 细胞免受损伤,从而改善糖代谢。白藜芦醇具有明显的抗氧化应激作用,可避免高糖、高脂诱导的氧化应激损伤,从而在糖尿病及其慢性并发症的防治中发挥重要作用。

参考文献:

[1] Faraj M, Lu HL, Cianflone KD. Lipids, and adipocyte secretagogues [J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82: 170-90.
 [2] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. *Nature*, 2006, 444 (7117): 337-42.
 [3] 常秀亭, 谢曦, 李婕, 等. 糖脉交泰胶囊调节 db/db 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的作用与机制 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(5): 177-80.

(下转封三页)

(上接1394页)

- [4] Fukushima M, Usami M, Ikeda M, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity at different stages of glucose tolerance: a cross-sectional study of Japanese type 2 diabetes[J]. *Metabolism*, 2004, 53(7): 831-5.
- [5] 李光伟, 潘孝仁, Stephen L, 等. 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(12): 656-60.
- [6] 常秀亭, 李 婕, 谢 曦, 等. 糖脉交泰胶囊对高糖高脂糖尿病大鼠糖脂代谢及肝脏葡萄糖激酶、低密度脂蛋白受体的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 234-7.
- [7] Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, et al. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding[J]. *Metabolism*, 2000, 49(1): 22-31.
- [8] Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice[J]. *Cell*, 1996, 84(3): 491-5.
- [9] Basu A, Basu R, Shah P, et al. Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity[J]. *Diabetes*, 2001, 50(6): 1351-62.
- [10] Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes [J]. *Cell*, 1999, 97(1): 9-12.
- [11] 傅世华. 糖尿病与脂代谢素论[J]. *糖尿病新世界*, 2005, 1: 25-6.
- [12] 王亚利, 范春雷, 窦晓兵. 绞股蓝总皂苷对肝细胞低密度脂蛋白受体表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(1): 138-9.
- [13] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, 343(6257): 425-30.
- [14] Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, et al. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(5): 470-9.
- [15] Haffner SM, D'agostino R, Mykkanen L, et al. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study [J]. *Diabetes Care*, 1999, 22(4): 562-8.
- [16] Maritim AC, Sanders RA, Diabetes WJ, et al. And antioxidants:a review[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1): 24-38.
- [17] Haskins KB, Powers K. Oxidative stress in type 1 diabetes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1005(11): 43-54.
- [18] 王薇彬, 谢自敬, 阿依努尔, 等. 2型糖尿病患者氧化应激状况及影响因素分析[J]. *中国糖尿病杂志*, 2007, 15(8): 487-9.
- [19] Naziroğlu M, Butterworth PJ. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Can J Appl Physiol*, 2005, 30(2): 172-85.

(编辑:孙昌朋)