

· 论 著 ·

短期胰岛素治疗对糖尿病大鼠内脏脂肪抵抗素 mRNA 表达的影响*

叶 颖, 廖 鑫, 黄 琦, 高 琳[△]

(遵义医学院附属医院内分泌科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 观察短期胰岛素治疗后糖尿病(DM)大鼠内脏脂肪组织抵抗素(resistin)mRNA 表达及血清抵抗素水平的变化。方法 采用小剂量链脲佐菌素(STZ)注射联合高糖高脂饲料喂养制备糖尿病大鼠模型,予胰岛素控制部分糖尿病大鼠血糖,设立空白对照组、血糖未控制组、血糖控制组。分别检测 3 组大鼠血清抵抗素水平及内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达;观察 3 组大鼠血清抵抗素、游离脂肪酸(FFA)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)水平及内脏脂肪抵抗素 mRNA 表达的变化。结果 与空白对照组比较,血糖未控制组大鼠血清抵抗素及内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达显著增高[(696.23±187.77) vs (538.31±142.14);(62.26±25.79) vs (10.15±12.13), $P<0.05$];与血糖控制组大鼠比较,血糖未控制组大鼠内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达亦显著增高[(62.26±25.79) vs (10.45±2.99), $P<0.05$]。血糖控制组大鼠 FFA 较血糖未控制组大鼠 FFA 水平显著降低[(0.53±0.16) vs (0.73±0.19), $P<0.05$],而 TC 水平显著增高[(1.92±0.16) vs (1.22±0.38), $P<0.05$]。结论 短期的胰岛素治疗能降低糖尿病大鼠内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达,可能与血糖控制后胰岛素抵抗改善及胰岛素负调节抵抗素 mRNA 表达有关。

关键词:抵抗素;糖尿病;大鼠;胰岛素;血糖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)19-1876-02

Effect of short-term insulin treatment on the expression of resistin mRNA in visceral adipose in diabetic rats*

Ye Ying, Liao Xin, Huang Qi, Gao Lin[△]

(Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To explore the influence of insulin treatment to the serum level and the expression in visceral adipose of resistin of diabetic rats. **Methods** The mode of diabetic rats was prepared by injected low dosage of streptozotocin(STZ) and fed with high sucrose and high fat diet. Blood glucose of part of diabetic rats was controlled by insulin, and separately establishing the blank group, the controlled group and the uncontrolled group according to the target levels of blood glucose. The serum resistin level and the resistin mRNA expression in visceral adipose in different blood glucose of diabetic rats were examined. The changes of serum resistin, FFA, TG, TC level and the expression of resistin mRNA of different blood glucose diabetic rats were observed. **Results**

The expression of resistin mRNA in visceral adipose and the serum resistin level were significantly increased in the uncontrolled blood glucose group of DM rats compared with those in normal control rats($P<0.05$), furthermore, the expression of resistin mRNA in visceral adipose were significantly increased in the group of uncontrolled blood glucose compared with those in the group of controlled blood glucose($P<0.05$). The level of serum FFA was significantly decreased in the group of controlled blood glucose compared with those in the group of uncontrolled blood glucose($P<0.05$), however, the serum level of TC was significantly increased in the group of controlled blood glucose($P<0.05$). **Conclusion** The expression of resistin mRNA in visceral adipose in diabetic rats can be reduced by short-term insulin therapy. It may relate to the improvement of insulin resistance and negative adjustment of insulin in the expressions of resistin mRNA after blood glucose being controlled.

Key words: resistin; diabetes mellitus; rats; insulin; blood glucose

抵抗素(resistin)是一种由脂肪细胞分泌的多肽类信号分子,又名脂肪组织特异性分泌因子(adipocyte secreted factor, ADSF)^[1]。研究表明其主要作用可能为对抗胰岛素使血糖水平升高,同时刺激脂肪细胞增殖导致肥胖,被认为是联系 2 型糖尿病、胰岛素抵抗及肥胖的纽带^[2]。然而,抵抗素作为一种细胞因子,其在肥胖、2 型糖尿病等疾病中的作用还颇受争议,对于动物和人类临床实验中的不同结果也需要进一步证实。本实验通过胰岛素控制糖尿病大鼠的血糖,观察其内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 表达的变化,探讨抵抗素在糖脂代谢中的作用,旨在为糖尿病的防治提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组 雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常对照组($n=14$),普通饲料喂养 6 周后等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液腹腔注射;糖尿病组($n=27$),高脂高糖饲料喂养 6 周后小剂量链脲佐菌素(STZ)40 mg/kg 一次性腹腔注射,于注射 3 d 后禁食 12 h,测定空腹尾末梢血糖,以空腹血糖(FBG)≥16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠成模标准。将糖尿病组分为血糖控制组和血糖未控制组,糖尿病血糖控制组($n=12$)每日皮下注射一次精蛋白锌胰岛素,控制 FPG<10 mmol/L;糖尿病血糖未控制组($n=15$),未用胰岛素控制血糖,

* 基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金资助项目[黔省专合字(2008)110 号];遵义市科技计划课题资金资助项目[遵市科合社字(2008)13 号]。 △ 通讯作者, Tel:13595286671; E-mail:Lgzycm@sina.com。

表 1 3 组实验大鼠糖脂代谢指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG(mmol/L)	FFA(μ mol/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
空白对照组	14	5.02 \pm 0.70	0.28 \pm 0.13	0.81 \pm 0.58	1.54 \pm 0.60
DM 血糖未控制组	15	25.29 \pm 4.35*	0.73 \pm 0.19*	2.52 \pm 2.31*	1.22 \pm 0.38
DM 血糖控制组	12	5.25 \pm 1.32#	0.53 \pm 0.16*#	1.20 \pm 0.83	1.92 \pm 0.16#

*: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; #: $P < 0.05$, 与血糖未控制组比较。

FBG \geq 16.7 mmol/L。普通饲料成分:玉米粉 80%,面粉 15%,黄豆粉 5%。高脂高糖饲料:普通饲料 65%、炼猪油 20%、蔗糖 10%和蛋黄 5%。

1.2 试剂及药品 STZ(美国 sigma 公司);大鼠抵抗素 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司);游离脂肪酸试剂盒(英国 RANDOX 公司);TRIzol Reagent 焦碳酸二乙酯(DEPC)、逆转录试剂盒 SYBR[®] GREEN PCRMaster Mix(宝生物工程公司);引物(宝生物工程有限公司)。精蛋白锌胰岛素注射液(江苏万邦生化医药公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 3 组大鼠待血糖稳定 1 周后禁食 12 h,分别取尾静脉血,离心分离血清测 FBG、FFA、TG、TC。采血后断头处死立即剖腹留取内脏脂肪置于 -70 °C 冰箱保存,用于 RT-PCR 方法测定抵抗素 mRNA 的表达。

1.3.2 观察指标 FBG 用强生稳步倍加型血糖仪及配套试纸检测;TG、TC 测定用日本 Olympus 公司 AU2700 型全自动生化检测仪;FFA 采用酶法;血清抵抗素测定采用竞争性酶联免疫吸附试验(ELISA)法;RT-PCR;SD 大鼠内脏脂肪组织提取总 RNA,以此 RNA 为模板逆转录合成 cDNA 第一链。引物序列:上游 5'-TCA TGC CCA GAA CCG AGT TG-3',下游为 5'-TCA TCC ATG GGA CAC AGT GAC A-3'。反应条件:95 °C 预变性 8 min,95 °C 变性 15 s,63.1 °C 退火 1 min,共循环 45 次。以 Ct 值为统计参数,相对定量法计算出二者比值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,所有计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验。组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠糖脂代谢指标比较 与空白对照组比较,糖尿病血糖未控制组大鼠 FBG 血清游离脂肪酸(FFA)、TG 水平均显著增高($P < 0.05$),而 TC 水平降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);血糖控制组大鼠血清 FFA 水平显著增高($P < 0.05$),TG、TC 水平亦增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与血糖未控制组大鼠比较,血糖控制组大鼠 FBG 血清 FFA 水平显著降低($P < 0.05$),TG 水平降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 TC 水平显著增高, $P < 0.05$ (表 1)。

表 2 3 组大鼠血清抵抗素浓度和内脏脂肪抵抗素 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抵抗素(μ g/L)	抵抗素 mRNA
空白对照组	14	538.31 \pm 142.14	10.15 \pm 12.13
DM 血糖未控制组	15	696.23 \pm 187.78*	62.26 \pm 25.79*
DM 血糖控制组	12	692.12 \pm 167.58	10.45 \pm 2.99#

*: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; #: $P < 0.05$, 与血糖未控制组比较。

2.2 各组大鼠内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 表达及血清抵抗素浓度比较 与空白对照组比较,血糖未控制组大鼠内脏脂肪

组织抵抗素 mRNA 表达及血清抵抗素水平均显著增高($P < 0.05$)。与血糖未控制组比较,血糖控制组大鼠内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$),而两组间血清抵抗素水平比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ (表 2)。

3 讨论

肥胖及相关的胰岛素抵抗是导致 2 型糖尿病发生的重要因素,但其之间的具体联系和机制还不很清楚。脂肪组织是一个重要的内分泌器官,可分泌多种脂源性细胞因子参与机体的各项生理活动。它被认为参与了胰岛素抵抗和肥胖的发生^[3-4]。目前大量研究结果表明抵抗素具有胰岛素抵抗、升高血糖的作用,已成为糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗和心血管疾病相互关联的关键环节。抵抗素与糖尿病的关系研究不仅可以探讨糖尿病的发病机制,而且可能为糖尿病治疗提供新途径。

Steppan 等^[5]的研究发现,重组的抵抗素在体内可以引起正常小鼠的葡萄糖不耐受,体外可以阻碍胰岛素刺激的葡萄糖吸收;去除抵抗素可以使饮食诱导的肥胖小鼠体内的血糖下降 20%,胰岛素的敏感性增高;抗抵抗素的免疫球蛋白 G 也可以增加胰岛素刺激的葡萄糖的吸收。Haugen 等^[6]发现在 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化第 3 天,能检测到抵抗素 mRNA,第 4 天达高峰,生理浓度胰岛素能明显降低抵抗素 mRNA 表达,因此他认为胰岛素可能是抵抗素分泌的一个主要抑制因子。本实验研究结果显示,与空白对照组比较,血糖未控制组大鼠血清抵抗素浓度及内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达均显著增高;予胰岛素控制糖尿病大鼠血糖后,与血糖未控制组大鼠比较,血糖控制组大鼠内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达显著降低,但血清抵抗素水平比较差异两者无统计学意义,一方面提示抵抗素是促使血糖升高的因素之一,这与 Steppan 等^[5]报道一致;另一方面说明胰岛素可能会导致内脏脂肪组织抵抗素 mRNA 的表达降低,但短期使用胰岛素降低血糖对血清抵抗素的水平无明显影响,糖尿病大鼠血清抵抗素水平的变化可能不随短期血糖的变化而变化,这与 Haugen 等^[6]报道相符。

近来的研究显示小鼠体内抵抗素在脂代谢中也起着重要的作用。曾有学者对腺病毒基因转染的 C57BL/6 小鼠进行研究,发现在过量表达抵抗素时其血中总胆固醇及三酰甘油的浓度显著增高,而高密度脂蛋白显著下降^[7]。长期高脂饮食导致血浆 FFA 升高,造成 IR 和胰岛分泌功能异常,常被称为脂毒性作用^[8]。高抵抗素血症使胰岛素对脂肪组织的脂解抑制作用减弱致血浆游离脂肪酸含量升高^[9],本实验结果与多数研究结果一致。与空白对照组比较,糖尿病血糖未控制组大鼠血清 FFA、TG 显著增高。与血糖控制组比较,糖尿病血糖未控制组大鼠血清 TC 水平减低,考虑与本实验糖尿病血糖未控制组大鼠精神状态较差,进食较少,故血清 TC 水平反而下降,通常高糖高饱和脂肪膳食后,肝脏羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG CoA)还原酶活性增加,胆固醇的合成增加,故糖尿病血糖控制组大鼠 TC 水平增高。(下转第 1880 页)

不一致,其表现出的对肿瘤的发生和转移具体的促进或抑制作用也不尽相同。也有学者认为这是由于 THBS1 的作用具有时间上的两相性,肿瘤发生初期以血管生长和逃避宿主免疫反应为主,THBS1 可以通过抑制肿瘤血管的生长而发挥抑癌作用。而随着肿瘤的发展,肿瘤原发灶周围细胞外基质被降解、肿瘤细胞侵入血管或者淋巴管继而经过靶器官定位发生转移,在此过程中,THBS1 可以作为黏附分子或者细胞外蛋白酶,通过抑制宿主的免疫反应促进肿瘤的发展和扩散。从间接作用来看,THBS1 对肿瘤发生的不同作用也可能与其激活 TGF- β 通路,借由 TGF- β 产生对肿瘤的双向调节作用有关^[5-6]。

最新的研究证实,食管癌组织内 THBS1 表达增多,且与食管癌的 TNM 分期和区域淋巴结转移有关。THBS1 过表达,刺激食管癌细胞内 TGF- β 信号通路的活化能力增强,使其下游通路的 Cyr61 和 CTGF 表达增多;当患者食管癌组织内 THBS1、Cyr61 以及 CTGF 中的 2 种或者以上发生高表达时,其生存率则明显降低,显示 THBS1 的高表达与食管癌患者的预后不良相关^[7]。

尽管 THBS1 在食管癌中的表达上调已经被实验所证明,但 THBS1 基因多态性与食管癌的发生和转移间的关系却少见报道。THBS1 介导细胞的黏附、迁移以及对肿瘤血管生成的调控都与肿瘤发生和转移息息相关。THBS1 在发挥上述作用时,需要依赖其具有功能的结构域与多种细胞外基质或者细胞表面的受体结合,因此在食管癌组织中,THBS1 作用的发挥不仅与其表达的量有关,也与表达的 THBS1 蛋白的质有关。

rs2292305 位于 THBS1 基因的编码区,在汉族人群中的杂合率为 0.433,rs2292305 的多态性改变为 G \rightarrow A,属于非同义编码 SNP,会导致基因产物的 523 位氨基酸由丙氨酸(GCC)变为苏氨酸(ACC)。因此,该多态性会对 THBS1 基因的表达或功能造成一定的影响,从而在食管癌的发生中产生作用。本

研究结果显示,该多态性确实会影响食管癌的发生,提示 THBS1 基因是食管癌发病的易感基因之一。THBS1 基因多态性的研究有助于进一步揭示 THBS1 基因的表达在肿瘤发生和发展机制中所发挥的作用。但该基因 rs2292305 位点的多态性以何种机制参与食管癌的发生和发展,以及该多态性会导致怎样的基因功能变化,仍需进一步的研究和探讨。

参考文献:

- [1] 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2008:10-78.
- [2] Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7):1835-1839.
- [3] Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1[J]. *FASEB J*, 1996, 10(10):1183-1191.
- [4] Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo[J]. *Cell*, 1998, 93(7):1159-1170.
- [5] Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(5):700-712.
- [6] Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and prometastatic factor in human cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1):21-62.
- [7] Zhou ZQ, Cao WH, Xie JJ, et al. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:291-298.

(收稿日期:2010-12-02 修回日期:2011-02-10)

(上接第 1877 页)

综上所述,用胰岛素控制糖尿病大鼠血糖能导致抵抗素 mRNA 表达下降,可能与血糖控制后胰岛素抵抗改善,胰岛素负调节抵抗素 mRNA 表达有关。但本实验血清抵抗素浓度未显示明显变化,可能血清中抵抗素浓度变化还需要较长时间的血糖变化影响,也可能表明胰岛素的治疗仅在基因水平调节抵抗素表达。进一步开展胰岛素严格控制血糖对抵抗素影响的研究,将有助于阐明抵抗素在糖尿病发病机制中的作用,有望为糖尿病的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李丙蓉,邓华聪. 抵抗素研究进展[J]. *重庆医学*, 2003, 32(12):1751-1754.
- [2] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. *Nature*, 2001, 409(3):307-312.
- [3] Steppan CM, Wang J, Whitman EL, et al. Activation of SOCS-3 by resistin[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4):1569-1575.
- [4] Satoh H, Nguyen MTA, Miles PDG, et al. Adenovirus mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo in-

ulin resistance in normal rats[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2):224-231.

- [5] Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2):502-506.
- [6] Haugen F, Jorgensen A, Dreven CA, et al. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. *FEBS Lett*, 2001, 507(1):105-108.
- [7] Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, et al. Adenovirus mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1):273-279.
- [8] 方超,杨刚毅,李伶,等. 高脂诱导胰岛素抵抗大鼠糖代谢及血抵抗素、脂联素水平的变化[J]. *重庆医学*, 2006, 35(10):865-867.
- [9] Ort T, Arjona AA, Rotenberg ME, et al. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5):2200-2209.

(收稿日期:2010-12-29 修回日期:2011-02-19)