

胰岛素对糖尿病大鼠代谢紊乱的调节作用*

邵 兰^① 黄 晴^② 苗振川^① 李清焕^{①**}

(^①中国科学院动物研究所 北京 100080; ^②沈阳卫生防疫站 沈阳 110031)

摘要: 利用四氧嘧啶建立糖尿病大鼠模型,研究了胰岛素对糖尿病大鼠脂肪、蛋白质、自由基代谢紊乱的调节作用及对机体和肝脏氧化损伤的保护作用。结果表明,胰岛素 0.5 U/kg 皮下注射 8 周,能明显抑制糖尿病引起大鼠体重的降低。皮下注射 6 周,显著提高了血清总蛋白、白蛋白、总胆固醇的水平,降低了血清甘油三酯的含量。胰岛素 1 U/kg 皮下注射 9 d,能显著提高血清超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性,降低血清丙二醛的含量及促氧化酶黄嘌呤氧化酶的活性,提高肝线粒体谷胱甘肽过氧化物酶的活性,降低肝线粒体丙二醛的含量。从而调节糖尿病大鼠脂肪、蛋白质、自由基代谢紊乱,减轻机体的氧化损伤,改善肝功能。

关键词: 胰岛素;糖尿病;代谢紊乱;氧化损伤

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)02-23-05

Regulation Effect of Insulin on Metabolic Dysfunction of Diabetic Rats

SHAO Lan^① HUANG Qing^② MIAO Zhen-Chuan^① LI Qing-Huan^①

(^①Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080;

^②Health and Anti-Epidemic Center of Shenyang City, Shenyang 110031, China)

Abstract: The objective of this research was to observe the regulatory effects of insulin on lipid, protein and radical metabolic dysfunction, and its Anti-oxidative effect on the liver and body in Diabetic rats. Rats were injected iv with alloxan 40 mg/kg to induce diabetes. Insulin 0.5 U/kg s.c administered daily for 8 weeks obviously increased the body weight of diabetic rats. Insulin 1 U/kg s.c daily for 6 weeks improved the amount of TC, TP, Alb, decreased the amount of TG. Insulin 1 U/kg s.c daily for 9 days improved the activity of T-SOD, GSH-Px, reduced the activity of XOD in the blood serum of diabetes rats, reduced the production of MDA and remarkably improved the activity of GSH-Px in liver mitochondria. So insulin can improve lipid, protein and radical metabolic function and prevent injury from oxidation of the liver and body in diabetes rats.

Key words: Insulin; Diabetes mellitus; Metabolize dysfunction; Oxidative damage

胰岛素是由胰腺中胰岛 β 细胞分泌的一种多肽类激素,在体内担负着许多重要物质代谢和能量代谢的调节作用,并有调节细胞生长和分化的细胞因子作用。胰岛素最显著的生理功能是调节内环境糖浓度的稳定,是治疗糖尿病最重要的药物,胰岛素对糖尿病的治疗不仅与降糖作用有关,它还可以通过调节脂肪、蛋白质

的代谢,DNA、RNA的合成以及某些基因的表达

* 中国科学院知识创新工程领域前沿项目资助(No. KSCX3-10Z-03);

** 通讯作者;

第一作者介绍 邵兰,女,28岁,博士;研究方向:细胞生物学。

收稿日期:2002-08-15,修回日期:2003-01-10

来改善糖尿病的症状。近年来的临床和药理实验表明^[1],糖尿病发病过程中胰岛素缺乏,除糖代谢外,脂肪代谢和蛋白质代谢均发生紊乱。脂肪组织中甘油三酯(TG)大量水解,进入血液循环,脂肪组织的萎缩使糖尿病患者表现极度消瘦。Mclean 等^[2]发现,糖尿病大鼠与固醇(TC)代谢有关的细胞内酶和蛋白的改变,导致固醇代谢及类固醇激素合成的紊乱。肝脏上具有大量胰岛素受体,在糖尿病情况下,肝脏得不到胰岛素的滋养,导致其正常功能的损害,而且代谢紊乱产生的有害物质积聚,反过来进一步伤及肝细胞线粒体,造成严重的氧化应激损伤^[3]。肝脏合成的蛋白质是血浆蛋白的重要来源^[4],糖尿病大鼠肝细胞线粒体超微结构改变,能量供应受损,核糖体合成蛋白质的活性下降,因而肝合成蛋白质的能力减弱。此外,糖尿病发病过程中,还伴随着自由基代谢的失调。因此探讨胰岛素对糖尿病大鼠物质代谢的调节作用及氧化损伤的保护作用,对于深入研究胰岛素治疗糖尿病的作用机制,发掘胰岛素新的治疗作用都是重要的。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 四氧嘧啶(Alloxan):Sigma 公司产品,临用前配制成浓度为 40 mg/ml 的溶液。中性胰岛素注射液:上海生物化学制药厂产品。丙二醛(MDA)试剂盒,谷胱甘肽过氧化物(GSH-Px)试剂盒,黄嘌呤氧化酶(XOD)试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(以上试剂盒均购自南京健安生物工程公司);糖化血红蛋白试剂盒为 Bio-Rad 公司产品;血糖试剂盒,甘油三酯(TG)试剂盒,总胆固醇(TC)试剂盒,总蛋白(TP)试剂盒,血清白蛋白(Alb)试剂盒(以上试剂盒均购自北京中生生物工程公司)。

1.2 仪器 紫外分光光度计:BECKMAN,USA;台式离心机:HITACHI,JAPAN。

1.3 实验动物及模型 SD 大鼠 100 只,雄性,体重为(220 ± 10)g,中科院动物所实验动物中心提供(二级,合格证号 006),饥饿 24 h 后,尾静脉注射 Alloxan 溶液,按 40 mg/kg 体重给药。

饲养 10 周后,测定其血糖浓度、血红蛋白糖激化程度,筛选出 10 周内维持高血糖水平的大鼠模型 46 只^[5]。将模型大鼠按血红蛋白糖激化程度平均分为糖尿病模型组 23 只和注射胰岛素组 23 只,并保证每组实验大鼠平均血红蛋白糖激化程度一致,同时每组实验大鼠的平均体重基本保持一致,另设一正常组 23 只。胰岛素组注射不同剂量胰岛素,正常组、糖尿病组注射等剂量生理盐水。治疗开始后,各组大鼠每周称体重一次,以初始给药时每组平均体重为 100%,计算各组大鼠体重变化。

1.4 实验方法

1.4.1 实验大鼠血糖、血红蛋白糖激化程度测定 糖尿病大鼠,造模 10 周后,断食 12 h,自由饮水,经眼后静脉丛取血 1 ml。其中一部分分离血清,采用葡萄糖氧化法试剂盒测定血糖值;另一部分,加入抗凝剂,用微型离子交换柱试剂盒测定血红蛋白值。

1.4.2 血清中 TG、TC、TP、Alb 含量的测定 糖尿病大鼠,治疗第 6 周,按上述方法断食,取血,迅速以 3 000 r/min 离心 3 min,分离血清,按试剂盒方法测定。

1.4.3 血清中 T-SOD、GSH-Px、XOD 酶活性、MDA 含量的测定 糖尿病大鼠断食、取血,分离血清,按试剂盒方法测定上述指标。

1.4.4 肝线粒体的制备 糖尿病大鼠断头处死取出肝脏,用介质冲洗,制备均浆,600 g、10 000 g 反复离心,制备肝细胞线粒体^[6]。制备介质为 250 mmol/L Sucrose, 0.1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L Hepes(pH 7.4)。线粒体蛋白含量的测定采用双缩脲法。

1.4.5 肝线粒体 MDA 含量、GSH-Px 酶活性的测定 制备糖尿病大鼠肝线粒体,按试剂盒方法测定 MDA 含量及 GSH-Px 酶活性。

1.5 统计方法 结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,组间比较用 *t*-检验。

2 结 果

2.1 血糖及糖化血红蛋白 Alloxan 40 mg/kg 尾静脉注射,饲养 10 周后(标注饲料,自由饮

水),实验大鼠血糖浓度、糖化血红蛋白值有非常显著的升高,与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.001$)(表1)。

表1 造模10周后实验动物血糖及糖化血红蛋白水平的比较($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	T-SOD (U/L)	XOD (U/g·pro)
正常组	—	23	132.53 ± 24.86	1.70 ± 0.37
造模组	40	46	378.64 ± 51.22***	3.92 ± 1.01***

与正常组比较 *** $P < 0.001$

2.2 胰岛素治疗后对各组大鼠体重的影响

胰岛素治疗8周内,正常对照组大鼠平均体重明显升高,这是正常的生理表现;模型组大鼠平均体重在8周内明显降低,并保持下降趋势,表现出糖尿病体症;胰岛素治疗组大鼠的平均体重也有上升趋势,说明通过胰岛素治疗控制了糖尿病的发展进程(图1)。

2.3 胰岛素对糖尿病大鼠血清甘油三酯含量、

表2 胰岛素对糖尿病大鼠血清甘油三酯含量、胆固醇含量、总蛋白、白蛋白含量的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)
正常组	—	15	63.79 ± 18.39	72.24 ± 12.31	7.79 ± 0.39	4.24 ± 0.41
糖尿病组	—	15	121.14 ± 41.17 $\Delta\Delta\Delta$	63.42 ± 15.60 Δ	6.14 ± 0.97 $\Delta\Delta\Delta$	3.02 ± 0.80 $\Delta\Delta\Delta$
胰岛素组	0.5	15	80.88 ± 33.70**	66.67 ± 9.26	6.88 ± 0.70*	3.62 ± 0.36*

与正常组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与糖尿病组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 胰岛素对糖尿病大鼠血清 T-SOD、XOD

活性的影响 胰岛素(s.c 1 U/kg) 9 d 对 Alloxan 所致糖尿病大鼠血清抗氧化酶 T-SOD 活性的降低有显著升高作用($P < 0.05$),对促氧化酶 XOD 活性的升高具有明显降低作用($P < 0.05$)(表3)。

表3 胰岛素对糖尿病大鼠血清 T-SOD、XOD 活性的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	T-SOD (U/L)	XOD (U/g·pro)
正常组	—	8	23.96 ± 5.04	54.72 ± 6.02
糖尿病组	—	8	12.46 ± 8.00 $\Delta\Delta$	70.04 ± 10.25 Δ
胰岛素组	0.5	8	16.73 ± 2.05*	54.60 ± 6.87*

与正常组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$; 与糖尿病组比较

* $P < 0.05$

2.5 胰岛素对糖尿病大鼠血清 GSH-Px 酶活

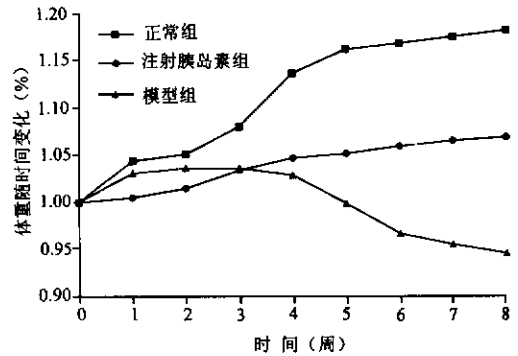


图1 胰岛素长期治疗对糖尿病大鼠体重的影响

总胆固醇含量、总蛋白水平的影响 胰岛素(s.c 1 U/kg) 6 周对 Alloxan 所致糖尿病大鼠血清甘油三酯的含量有显著降低作用($P < 0.01$),对总胆固醇的降低有升高趋势但无明显影响($P < 0.05$),对糖尿病大鼠血清总蛋白水平、血清白蛋白水平的降低具有明显升高作用($P < 0.05$)(表2)。

性、MDA 含量及 GSH-Px/MDA 的影响 胰岛素(s.c 1 U/kg) 9 d 对 Alloxan 所致糖尿病大鼠血清自由基产物 MDA 含量的增加具有明显降低作用($P < 0.001$),对糖尿病大鼠血清抗氧化酶 GSH-Px 活性的降低有显著升高作用($P < 0.05$),因而非常显著地提高血清中抗氧化值 GSH-Px/MDA ($P < 0.001$)(表4)。

2.6 胰岛素对糖尿病大鼠肝线粒体 GSH-Px 酶活性、MDA 含量及 GSH-Px/MDA 的影响

胰岛素(s.c 1 U/kg) 9 d 对 Alloxan 所致糖尿病大鼠肝线粒体抗氧化酶 GSH-Px 活性的降低有显著升高作用($P < 0.05$),对肝细胞线粒体自由基产物 MDA 含量的增加具有明显降低作用($P < 0.001$),因而非常显著地提高血清中抗氧化值 GSH-Px/MDA ($P < 0.001$)(表5)。

表 4 胰岛素对糖尿病大鼠血清 GSH-Px 酶活性、MDA 含量、GSH-Px/MDA 的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量(U/kg)	n	MDA(nmol/ml)	GSH-Px(IU)	GSH-Px/MDA
正常组	—	8	3.93 ± 0.76	73.11 ± 20.50	19.30 ± 4.14
糖尿病组	—	8	8.86 ± 1.92 ^{ΔΔΔ}	52.31 ± 13.44 ^Δ	6.98 ± 2.81 ^{ΔΔΔ}
胰岛素组	1	8	3.90 ± 0.87 ^{***}	71.33 ± 12.39 [*]	18.69 ± 3.96 ^{***}

与正常组比较 $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta P < 0.05$; 与糖尿病组比较 $*** P < 0.001$, $* P < 0.05$

表 5 胰岛素对糖尿病大鼠肝线粒体 GSH-Px 酶活性、MDA 含量、GSH-Px/MDA 的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量(U/kg)	n	MDA(nmol/ml)	GSH-Px(IU)	GSH-Px/MDA
正常组	—	8	3.96 ± 0.52	20.70 ± 3.40	5.40 ± 0.48
糖尿病组	—	8	4.87 ± 0.47 ^{ΔΔ}	17.03 ± 2.90 ^Δ	3.49 ± 0.24 ^{ΔΔΔ}
胰岛素组	1	8	3.69 ± 0.33 ^{***}	20.33 ± 6.09 [*]	5.54 ± 1.12 ^{***}

与正常组比较 $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$; 与糖尿病组比较 $*** P < 0.001$, $* P < 0.05$

3 讨论

研究表明^[7],用四氧嘧啶诱导糖尿病后大鼠的体重明显下降,这与机体脂肪代谢紊乱、多糖、蛋白质分解代谢加快、自由基代谢紊乱等因素均有关系。作者的实验证明糖尿病大鼠血清中 TG 含量升高,TC、TP 含量降低,说明糖尿病大鼠除糖代谢外,脂肪和蛋白质代谢也严重失调。Alb 是肝脏合成量最大的蛋白,血清 Alb 含量的下降,提示肝脏合成能力的下降及肝功能的损伤。糖尿病代谢紊乱衍生的有害物质如自由基等的积累均会对肝脏产生损害。实验表明糖尿病大鼠肝线粒体的 GSH-Px 活性明显降低,肝线粒体 MDA 生成量也明显增加。同时血清中主要自由基清除酶 GSH-Px、SOD 活性明显降低,与自由基生成密切相关的 XOD 活性明显升高,血清 MDA 生成量也增多,血清和肝线粒体内的抗氧化指标 GSH-Px/MDA 比值均明显降低。因此由于自由基清除能力的减弱及自由基生成量的增加,机体包括肝脏必然受到氧化损伤。

注射胰岛素后,大鼠血清中 TG 含量降低,TC 含量升高,说明在胰岛素作用下,同化作用加强,脂肪分解得到抑制,与 TC 合成相关的酶活性增强,进而导致 TC 含量升高。有报道^[3]胰岛素可通过增加氨基酸供应,调节基因表达,改善肝细胞超微结构等作用促进蛋白质合成。同时胰岛素治疗后,GSH-Px、SOD 等抗氧化酶的活

性明显升高,促氧化酶 XOD 的活性明显降低,而 MDA 含量与糖尿病组比较也明显下降。表明了胰岛素在有效地抑制机体脂质过氧化反应发生的同时,还能通过提高抗氧化酶、抑制促氧化酶的活性来加速自由基清除,减少自由基产生,从而保护机体功能免受氧化损伤。进一步的实验证明胰岛素可通过升高肝线粒体 GSH-Px/MDA 比值,降低肝线粒体活性氧的生成,保护肝线粒体的结构和功能^[8,9],从根本上抑制自由基链式反应的发生,降低糖尿病患者肝脏的氧化损伤,提高 TP 和 Alb 的合成。因此,胰岛素对糖尿病的治疗,不仅是由于它的降糖作用,而且与它改善物质代谢、抗氧化的作用有关。

参 考 文 献

- [1] 钟学礼,朱禧星.临床糖尿病学.上海:上海科学技术出版社,1989.
- [2] Mclean M P, Zhao Z, Ness G C. Reduced hepatic LDL-receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and sterol carrier protein expression is associated with pregnancy loss in the diabetic rat. *Endocrine*, 1995, 3:695 ~ 703.
- [3] Aoki T T, Benbafka M M, Dkinura M C, et al. Long-term intermittent intravenous insulin therapy and type I diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 342:515 ~ 519.
- [4] Jefferson L S, Liao W S, Peavy D E, et al. Diabetes-induced alteration in liver protein synthesis. *J Biol Chem*, 1983, 258(2): 1369 ~ 1375.
- [5] 郭鹤.人类的动物模型.北京:人民卫生出版社,1985.
- [6] Baynes J W, Thorpe S R. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*, 1999, 48: 1 ~ 9.
- [7] Frayn K N, Coppack S W, Humphreys S M. Coordinated

- regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue *in vivo*. *Adv Enzyme Reg*, 1995, 35: 163 ~ 178.
- [8] Huang Q, Shao L, Jiang H. Effect of insulin on oxygen free radicals and oxidarive phosphorylation in liver mitochondria of diabete rats. *Acta Pharmacologia Sinica*, 2001, 22(5): 455 ~ 458.
- [9] 邵兰,李清焕,黄晴. 胰岛素对糖尿病大鼠肝线粒体氧化损伤的保护作用. *动物学杂志*, 2002, 37(5): 28 ~ 31.