文章编号:1000-5404(2008)09-0779-04

论著

长程高脂饲料对雌雄大鼠胰岛功能损害差异的探讨

王 喆[1],甘立霞[1],卢忠燕[1],何凤田[1],邹全明[2] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,[2]医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 动态观察长程高脂饲料对雌雄大鼠糖耐量和胰岛素作用的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 取正常 SD 大鼠 100 只,抽签式随机分组,其中雄性和雌性大鼠普通饲料组各 20 只,雄性和雌性大鼠高脂饲料组各 30 只。每个月动态监测大鼠体质量及空腹血糖的变化,在第 14 个月时进行腹腔注射糖耐量试验(IPGTT),检测葡萄糖耐量减退(IGT)的情况,测定第 14 个月时的空腹胰岛素分泌量及大鼠胰腺组织匀浆液中线粒体和微粒体的丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和过氧化氢酶(catalase,CAT)水平。**结果** 第 14 个月时无论普食组或高脂组雄性大鼠腹腔注射糖耐量都受损,而雌性大鼠都未达到糖耐量受损,腹腔糖耐量测试表明雌雄大鼠在 120 min 时血糖有显著性差异($P<0.05$);14 个月时高脂组雄性大鼠空腹胰岛素分泌量显著高于雌性大鼠($P<0.05$);胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)显示高脂组雄性大鼠胰岛素抵抗程度较雌性大鼠显著升高($P<0.05$);早相胰岛素分泌功能显示经过长程高脂喂养,雄性大鼠早相胰岛素分泌功能显著低于雌性大鼠($P<0.05$);胰腺组织匀浆液中线粒体的 MDA、细胞质的 GSH 和 CAT 的水平雌雄大鼠间虽然无显著性差异($P>0.05$),但总体趋势是无论是普食组还是高脂组,雄性大鼠氧化应激水平都高于雌性大鼠,抗氧化应激水平都低于雌性大鼠。**结论** 雌性大鼠具有抵抗高脂诱导的糖耐量受损作用,其胰腺组织氧化应激水平较低可能是机制之一。

关键词:长程高脂;雌雄大鼠;胰岛功能;氧化应激
中图法分类号:R-33;R151.1;R587.02 **文献标识码:**A

Gender difference of impaired pancreatic function induced by long-term high-fat diet and its underlying mechanism

WANG Zhe[1], GAN Li-xia[1], LU Zhong-yan[1], HE Feng-tian[1], ZOU Quan-ming[2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, [2]Department of Clinical Microbiology, College of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of long-term high-fat diet (HF) on glucose tolerance and insulin action in male and female SD rats and the underlying mechanism. Methods Totally 100 SD rats were equally divided by gender and further subgrouped into standard laboratory chow (SC, $n=20$) and HF groups ($n=30$), respectively. Body weight and fasting glucose levels were measured every month, and intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed in the 5, 8, 10 and 14 months. At the 14th month, fasting plasma insulin concentration was measured, and the contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and catalase in different fraction of pancreatic homogenates, mitochondria or microsome, were determined. Results Impaired glucose tolerance was observed in both SC and HF male rats but not in female rats. Fasting insulin levels and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were higher in male rats than in female rats from SC groups and significantly higher in HF feeding rats. Whereas, insulin secretion capacity was significantly lower in male than in female. MDA in pancreatic mitochondria was higher and GSH and catalase in pancreatic cytosol was lower in male than in female. Conclusion Female are relatively protected from induced glucose tolerance under HF feeding and is likely, at least in part, from ameliorated oxidative stress in pancreas.

Key words: high-fat diet; female and male rats; pancreatic function; oxidative stress

基金项目:国家自然科学基金(30570888,30670998);全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H025)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570888, 30670998) and the Foundation of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H025)

作者简介:王 喆,男,安徽省天长市人,硕士研究生,助教,主要从事糖代谢的调控机制方面的研究。电话:(023)68752947,E-mail:wangzhe_com@sohu.com
通信作者:甘立霞,E-mail:ganlixia@yahoo.com

收稿日期:2008-01-21 **修回日期:**2008-03-14

糖尿病是21世纪人类健康所面临的重大挑战。2003年国际糖尿病联盟根据流行病学的调查发现糖尿病和糖耐量受损的发病率分别是5.1%和8.2%[1]。糖尿病是由环境因素和遗传因素共同作用的结果,而糖尿病的发生是否存在性别差异,目前还有争议。有研究发现在大鼠动物模型当中,雄性大鼠非胰岛素依赖的糖尿病发病率高于雌性大鼠[2]。

长程高脂饮食是诱发糖尿病的重要环境因素之一。为了研究长程高脂饮食对雌雄大鼠胰岛功能性别间差异的影响,本研究采用单纯高脂肪膳食喂养正常SD大鼠14个月,观察长程高脂SD雌雄大鼠间糖耐量降低和胰岛素抵抗的过程,旨在模拟与现代人生活饮食结构及发病情况更为自然、相似的胰岛功能受损动物模型,为SD雌雄大鼠间胰岛功能受损差异的发生机制及其早期干预(如营养因素、饮食调节等)的研究提供动物模型和研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物模型的建立及分组 100只4~6周龄SPF级SD大鼠(由本校实验动物中心提供),体质量75~140 g,抽签式随机分组,其中雄性大鼠普通饲料组20只,雄性大鼠高脂饲料组30只,雌性大鼠普通饲料组20只,雌性大鼠高脂饲料组30只。每组5只大鼠一笼喂养,可自由摄食、摄水。标准饲料:按实验动物饲养国家统一标准营养要求配制(编号:GB14926-2001),其中碳水化合物54%,脂肪7.2%,蛋白质18%;高脂饲料:在标准饲料中加入1.5%食盐、0.5%白糖、20%猪油、4%麻油、20%花生、9%鸡蛋,该饲料中各营养物的终含量分别为碳水化合物37.5%,脂肪22.5%,蛋白质13.8%[3]。

1.1.2 主要试剂与仪器 血糖仪和血糖试纸(LifeTech,美国),胰岛素放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所),谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),PBS(北京中杉公司),Du-640型紫外分光光度计(Beckman,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 血糖的测定 血浆葡萄糖的测定采用血糖试纸法。

1.2.2 葡萄糖耐量试验(IPGTT) 第14个月时测血糖后动物禁食12 h,葡萄糖以2 g/kg腹腔注射,分别于注射后30、60、120 min剪尾采血,测定血糖浓度。至第14个月时,仍存活33只,其中雄性普食组9只,雄性高脂组9只,雌性普食组6只,雌性高脂组9只。

1.2.3 血浆胰岛素的测定及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的计算 血浆胰岛素用胰岛素放射免疫分析试剂盒测定。

HOMA-IR = 空腹血糖 × 空腹胰岛素/22.5

1.2.4 早相胰岛素分泌功能(insulinogenic index,IGI)检测

计算公式:$IGI = (I_{30} - I_0)/(G_{30} - G_0)$。$I_0$:在IPGTT中0 min时胰岛素分泌量;$I_{30}$:在IPGTT中30 min时胰岛素分泌量;$G_0$:在IPGTT中0 min时血糖值;$G_{30}$:在IPGTT中30 min时血糖值。

1.2.5 胰腺组织匀浆液中细胞质和线粒体的分离 将动物处死后,取0.5 g大鼠胰腺组织置于4.5 ml 1×PBS中,组织匀浆机破碎后,4 ℃,750×*g*离心10 min,收集上清作为细胞质部分;下层,4 ℃,10 000×*g*离心30 min,收集上清作为细胞质部分,沉淀用200 μl PBS溶解作为线粒体部分。

1.2.6 胰腺组织匀浆液中细胞质和线粒体的丙二醛(MDA)测定 500 μl样品加入1 000 μl TCA-TBA-HCl(15%三氟乙酸、0.375%硫代巴比妥酸、0.25 mol/L HCl)煮沸15 min,冰浴,1 000×*g*离心10 min,取上清液,535 nm检测。

MDA活性(nmol/mg) = $D(535)/1.56\times10^5$/胰腺组织总蛋白量[4]

1.2.7 胰腺组织匀浆液中细胞质和线粒体的谷胱甘肽(GSH)测定 采用GSH测定试剂盒,GSH(mg/g) = [测定管$D(412)$ − 测定空白管$D(412)$]/[标准管$D(412)$ − 空白管$D(412)$] × 标准管浓度 × GSH相对分子质量/组织匀浆蛋白含量。

1.2.8 胰腺组织匀浆液中细胞质和线粒体的过氧化氢酶(catalase,CAT)测定 10 μl样品加入100 μl 50 mmol/L磷酸钠、20 mmol/L H_2O_2,240 nm检测。

CAT活性(U) = $D(240)\times1\,000/43.6$/胰腺组织总蛋白量[4]

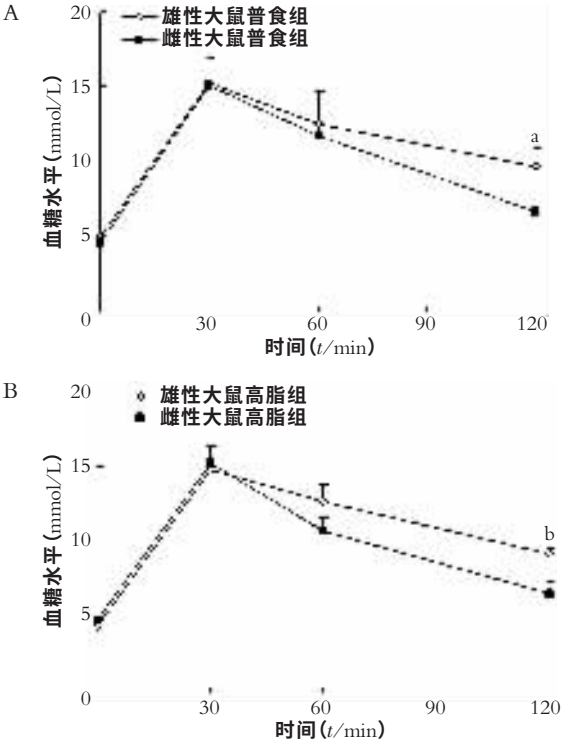
1.3 统计学处理

用Prism 3.0作图分析软件处理实验数据,数据以$\bar{x}\pm s$表示,雌雄大鼠普食组与雌雄大鼠高脂组的差异均进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 长程高脂饲料对雌雄大鼠葡萄糖耐量的影响

第14个月时无论普食组或高脂组雄性大鼠腹腔注射糖耐量都受损,而雌性大鼠都未达到糖耐量受损,腹腔糖耐量测试表明雌雄大鼠在120 min时血糖有显著性差异($P<0.05$,图1)。



A:普食组;B:高脂组 a:$P<0.05$,与雌性大鼠普食组比较;b:$P<0.05$,与雌性大鼠高脂组比较

图1 普食组和高脂组雌雄大鼠葡萄糖耐量比较

2.2　长程高脂饲料对雌雄大鼠空腹胰岛素及其敏感性的影响

第 14 个月时高脂组雌雄大鼠间空腹血糖变化无显著差异($P>0.05$),但雄性大鼠空腹胰岛素分泌量显著高于雌性大鼠($P<0.05$,表 1)。

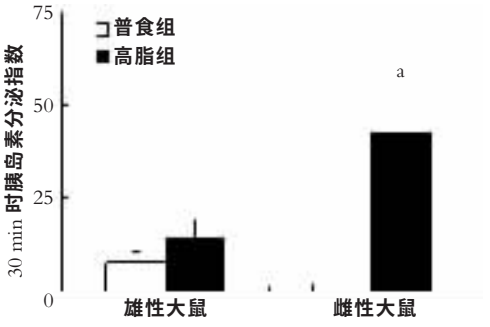
表 1　第 14 个月时各组体质量、空腹血糖、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数的测定($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量(g)	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(μIU/ml)	胰岛素抵抗指数
雄性大鼠普食组	9	845.6±45.2	5.0±0.3	81.6±16.1	18.2±4.2
雄性大鼠高脂组	9	743.5±50.3	4.6±0.1	100.1±13.9[a]	19.9±3.3[a]
雌性大鼠普食组	6	489.6±29.3	5.1±0.2	37.2±9.7	12.8±4.7
雌性大鼠高脂组	9	546.7±31.4	4.8±0.2	50.7±5.3	10.7±1.2

a:$P<0.05$,与雌性大鼠高脂组比较

2.3　长程高脂饲料对雌雄大鼠早相胰岛素分泌功能的影响

早相胰岛素分泌功能显示经过长程高脂喂养,雄性大鼠早相胰岛素分泌功能显著低于雌性大鼠($P<0.05$,图 2)。



a:$P<0.05$,与雄性大鼠高脂组比较

图 2　雌雄大鼠早相胰岛素分泌功能的比较

2.4　长程高脂饲料对雌雄大鼠胰腺氧化应激及抗氧化应激水平的影响

雌雄大鼠间胰腺组织匀浆液中线粒体的 MDA、细胞质的 GSH 和 CAT 水平虽然无显著性差异($P>0.05$),但总体趋势都是无论普食组还是高脂组,雄性大鼠氧化应激水平高于雌性大鼠,抗氧化应激水平都低于雌性大鼠(表 2)。

表 2　雌雄大鼠胰腺组织 MDA、GSH 和 CAT 的水平变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA(nmol/mg)	GSH(mg/g)	CAT(U)
雄性大鼠普食组	9	34.215±0.595[a]	9.973±1.099	30.150±2.365[a]
雄性大鼠高脂组	9	75.281±12.012	5.728±1.188	21.274±1.805
雌性大鼠普食组	6	30.720±4.797	10.830±0.598	30.622±1.939
雌性大鼠高脂组	9	58.655±10.668	9.844±1.735	24.453±2.792

a:$P<0.05$,与雄性大鼠高脂组比较

3　讨论

高脂饮食目前被认为是 2 型糖尿病及胰岛素抵抗综合征(即代谢综合征)发病的重要环境因素之一[5]。通过高脂饲料诱导实验动物产生胰岛素抵抗模拟人类 2 型糖尿病及胰岛素抵抗综合征的发病特征,是 2 型糖尿病及胰岛素抵抗相关研究的重要内容。本实验采用的 SD 大鼠经过 14 个月的高脂饲料喂养,建立了稳定的胰岛素抵抗模型,以进行胰岛功能的相关研究。糖耐量异常和早相胰岛素分泌减少是反映胰岛功能的重要指标。有研究表明:在 2 型糖尿病的发病中,胰岛 β 细胞功能受损通常先发生 10~12 年,因此,胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能受损是 2 型糖尿病的基础病变[6]。本研究显示,长程高脂喂养 14 个月后,腹腔注射糖耐量实验检测显示雄性大鼠糖耐量受损程度显著高于雌性大鼠;高脂组雄性大鼠空腹胰岛素分泌显著高于雌性大鼠。高脂组雄性大鼠 HOMA-IR 明显高于雌性大鼠。反之,早相胰岛素分泌功能在高脂组雄性大鼠显著低于雌性大鼠。这些研究结果提示在长程高脂喂养后,雄性大鼠胰岛功能受损情况明显较雌性大鼠严重。

导致出现以上结果的因素有很多,目前有研究明确老龄化可以使糖耐量降低以及胰岛素分泌减少[7],而雌激素能直接作用于胰岛 β 细胞的雌激素受体(ER),增强胰岛素敏感性,从而减少胰岛素的需要量[8]。除了以上两个因素,为了进一步研究长程高脂饮食后雌雄大鼠早相胰岛素分泌功能差异的机制,我们检测了雌雄大鼠胰腺组织氧化应激情况。氧化应激是指机体内高活性分子如活性氧簇(ROS)和活性氮簇(RNS)产生过多或消除减少,从而导致组织损伤。在正常状态下机体可产生少量 ROS 参与正常代谢,同时体内存在清除自由基、抑制自由基反应的体系,使得过多的自由基被清除或使自由基减少,从而保持自由基产生和清除的平衡;但在某些病理状态下,这一机制遭到破坏,体内自由基显著增加,过多的自由基可直接作用于机体,致机体损伤;同时,机体抗氧化防御能力下降,氧化能力显著超过抗氧化能力而发生氧化应激,机体内氧化应激的产生就是源于自由基产生增多和(或)抗氧化防御功能损害[9]。近年来,随着深入研究糖尿病及其并发症进程中氧化应激的产生机制,越来越多的证据显示氧化应激与糖尿病及并发症的发生、发展关系密切。

MDA 是脂质过氧化代谢的终产物,它能使大分子物质发生交联,使生物膜变性,细胞功能丧失[10]。有研究表明,2 型糖尿病大鼠病程后期,血清 MDA 水平显著升高[11]。GSH 对调节体内正常的糖代谢有重要作用,是一种重要的抗氧化剂,它能直接与氧化剂作用或通过 GSH 还原酶,清除或减少体内过高浓度的自由基,从而减轻氧化应激的损害。GSH 水平下降能引起 2 型糖尿病患者外周胰岛素敏感性下降和胰岛素分泌减少,静脉注射 GSH 不但使细胞 GSH/GSSG 水平升高,还可以提高外周组织对葡萄糖的摄取,改善外周组

织对胰岛素的敏感性和胰岛细胞分泌胰岛素的功能[12],同时GSH水平的升高有助于防止糖尿病并发症的发生[13]。CAT可将H_2O_2分解为H_2O和O_2,从而清除H_2O_2的细胞毒作用。我们的研究结果表明,经过长程高脂喂养后,雄性大鼠胰腺组织线粒体中MDA水平高于雌性大鼠,雌性大鼠胰腺组织细胞质中GSH和CAT水平高于雄性大鼠,虽然都无显著性差异,但总体趋势都是高脂组雄性大鼠氧化应激水平都高于雌性大鼠,抗氧化应激水平都低于雌性大鼠。

氧化应激水平的升高可以引起胰岛细胞的氧化损伤,使胰岛β细胞数量减少,以及β细胞的凋亡增加[14,15]。长程高脂饮食可以通过诱导氧化应激水平升高而使胰腺产生慢性损伤[16]。而我们的研究提示胰腺氧化应激水平升高,抗氧化应激水平下降可能是长程高脂对雌雄大鼠胰岛功能损害即早相胰岛素分泌差异的机制之一。

参考文献:

[1] Allgot B, Gan D, King H. Diabetes Atlas[M]. 2nd. ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2003:1-30.

[2] Gale E A, Gillespie K M. Diabetes and gender[J]. Diabetologia, 2001, 44(1):3-15.

[3] 卢忠燕, 甘立霞, 王 哲, 等. 长程高脂肪膳食对大鼠空腹血糖及糖耐量的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5):678-680.

[4] Wang X, Lu Y, Cederbaum A I. Induction of cytochrome P450 2E1 increases hepatotoxicity caused by Fas agonistic Jo2 antibody in mice[J]. Hepatology, 2005, 42(2):400-410.

[5] 田爱平, 郭赛珊, 申竹芳. 高脂饲料与胰岛素抵抗动物模型[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(3):267-269.

[6] Abdul-Ghani M A, Tripathy D, DeFronzo R A. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose[J]. Diabetes Care, 2006, 29(5):1130-1139.

[7] Chang A M, Halter J B. Aging and insulin secretion[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 284(1):E7-E12.

[8] Geisler J G, Zawalich W, Zawalich K, *et al*. Estrogen can prevent or reverse obesity and diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide[J]. Diabetes, 2002, 51(7):2158-2169.

[9] 范立群, 韦龙祥, 彭 鹰. 糖尿病与氧化应激的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2007,(4):629-631.

[10] 娄桂予, 江 渝, 彭家和, 等. 橙皮甙抗LDL氧化及对MCP-1 mRNA转录的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8):717-719.

[11] 何 敏, 徐济良, 吴 锋. 2型糖尿病大鼠主动脉内皮细胞氧化损伤及缬沙坦的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(3):354-358.

[12] Khamaisi M, Kavel O, Rosenstock M, *et al*. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: *in vivo* and *in vitro* studies using buthionine sulfoximine[J]. Biochem J, 2000, 349(Pt 2):579-586.

[13] Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, *et al*. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy[J]. J Nutr, 2002, 132(5):897-900.

[14] Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, *et al*. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type Ⅱ diabetic patients[J]. Diabetologia, 2002, 45(1):85-96.

[15] Fariss M W, Chan C B, Patel M, *et al*. Role of mitochondria in toxic oxidative stress[J]. Mol Interv, 2005, 5(2):94-111.

[16] Yan M X, Li Y Q, Meng M, *et al*. Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries *via* pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(1):192-199.

(编辑 张 维)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母$\bar{x}$,卡方的符号是希腊字母χ^2,自由度的符号是希腊文"υ",不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r",不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"-"或"+"表示。例如Na^+、Ca^{2+}、P^{3-}等等,不采用Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2}表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如:^{131}I、^{32}P。表示激发状态的m写在右上角,例如:$^{99}Tc^m$、$^{133}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA有rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3类。r、t、m是表示类型的符号应小写,RNA应大写。

本刊编辑部