胃旁路术预防 2 型糖尿病的实验研究

谢杰斌[1],庞月珊[2],魏寿江[1],王崇树[1],唐 锦[1] (1. 川北医学院附属医院胃肠外科,四川 南充 637000;2. 南充市中心医院老年科,四川 南充 637000)

[摘 要] **目的** 通过检测实验大鼠胰岛素及 GLP-1 等指标的变化,观察 Roux-en-Y 胃旁路术(RYGB)预防 2 型糖尿病的作用。**方法** 将 12 周龄的雄性 SD 大鼠分为 4 个组:A 组(假手术,正常饮食)、B 组(不行手术,DM 饮食 + STZ 注射)、C 组(行胃旁路术 + 正常饮食)和 D 组(行胃旁路术 + DM 饮食 + STZ 注射)。术后同时进行糖尿病模型诱导剂(STZ)及高脂饮食干预制备糖尿病模型。在不同的时间点,检测各组动物血糖、OGTT、体质量、进食量、饮水量等指标的变化。另外,检测胰岛素以及 HE 染色观察胰腺病理变化,同时通过应用 RT-PCR、Western blot 方法检测肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)基因和蛋白表达变化。**结果** 在术前与术后比较,4 组大鼠饮食、体质量都有明显的变化。胰腺 HE 染色提示驱散性水肿、充血,显示胰岛破坏严重。与假手术 + 正常饮食组相比,正常大鼠 + DM 饮食 + STZ 注射组 3 d 后血糖即明显升高,胰岛素、口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰岛素耐量试验(ITT)在不同时间段都有明显变化,差异具有统计学意义($P<0.05$)。并且肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 PEPCK 基因和蛋白表达也明显增高。与正常大鼠 + DM 饮食 + STZ 注射组相比,行胃旁路术 + DM 饮食 + STZ 注射组胰腺病理变化指标有明显改善,血糖、胰岛素、OGTT、GLP、ITT 均明显降低,PEPCK 基因和蛋白表达也明显降低。**结论** 胃旁路术对2 型糖尿病大鼠胰岛、胰岛素 OGTT、GLP-1、ITT 及 PEPCK 的变化有影响,胃旁路术对 2 型糖尿病的预防有一定的作用。

[关键词] 胃旁路术;2 型糖尿病;预防;PEPCK

[中图分类号] R605;R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)01-0011-07

Effect of Roux-en-Y gastric bypass postoperative on the blood glucose expression of type 2 diabetic rats

XIE Jie-bin[1], PANG Yue-shan[2], WEI Shou-jiang[1], WANG Chong-shu[1], TANG Jin[1] (1. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Institute of Hepatobiliary and Pancreatic Intestinal Disease, Nanchong Sichuan 637000, China; 2. Department of Geratology, Nanchong Central Hospital, Nanchong Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective Recent studies have found that Roux-en-Y gastric bypass(RYGB) can inhibit the levels of blood glucose in type 2 diabetes, but its mechanism still remains unknown. In present study, we observed the effect of RYGB on insulin and GLP-1of type 2 diabetes mice. **Methods** The 12-week-old male SD rats were divided into four groups: group A (no surgery, normal diet), Group B (no surgery, DM diet + STZ injection), group C (gastric bypass surgery + normal diet), group D (gastric bypass surgery + DM diet + STZ injection). One week after surgery rehabilitation, the diabetes model was built by STZ (revulsant of the classical diabetes model) and high-fat-control diet. After four months, the changes of blood glucose, OGTT, body weight, food intake, water intake in each group were examined. Furthermore, the pathological changes of insulin and pancreatic were detected by HE staining. Meanwhile, the liver PEPCK gene and protein expression were detected by using RT-PCR and Western blot. **Results** Four groups of rats all have significant changes in diet and weight. HE staining suggests the disseminated hyperemia and edema in pancreas and showed that islet has been severe damaged. Compared with no treatment normal diet, normal rat + DM diet + STZ injection, has a markedly elevated blood glucose level 3 days later, insulin, OGTT, GLP, and ITT all have remarkable changes in different time periods, with a statistically significance ($P<0.05$). Compared with the normal rat + DM diet + STZ injection group, RYGB + DM diet + STZ injection group showed that these indicators of pancreas pathological changes significantly, glucose, insulin, OGTT, GLP, ITT all have significantly drop, as well as the gene and protein expression of PEPCK ($P<0.05$). **Conclusion** RYGB can exert influence on the change of insulin, OGTT, GLP, ITT and PEPCK in islets of type 2 diabetes rats, which may play a positive role in the further clinical applications.

Keywords: Roux-en-Y gastric bypass; type 2 diabetic; prevention; PEPCK

Roux-en-Y 胃旁路手术(Roux-en-Y gastric bypass, RYGB)已成为 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)和肥胖患者比较有效的治疗方式[1-2]。2 型糖尿病患者行胃旁路术后血糖得到长期稳定的控制,已经在临床和实验中得到证实,得到了多数学者的认可[3]。临床研究证实胃旁路术术后 2 型糖尿病患者的

doi:10.11659/jjssx.07E015105

[基金项目] 四川省教育厅基金(13ZB0243);川北医学院科研发展计划项目(CBY12-A-QN20)

[通讯作者] 谢杰斌,E-mail:xiejiebin84@126.com

[收稿日期] 2015-08-13 [修回日期] 2015-09-10

血糖可迅速得到改善,且改善先于体质量的变化,而通过限制饮食和限制性的手术可调节胃绑带术均未能表现术后胰岛素抵抗和血糖耐受迅速改善[4]。目前认为主要的降糖机制是消化道重建后十二指肠和部分空肠被排斥出胰岛轴,以致未消化或完全消化的食物较早被送至远端空肠和回肠,引起肠道激素的变化达到降糖作用[5-6]。同时,可能涉及到影响肠激素、胆汁酸、肠道菌群、肠道葡萄糖传感和代谢等[6]。然而,这些疗效的机制仍然不够明确,胃旁路术后糖尿病的发病率是否下降以及其远期的降糖效果目前尚不清楚。

临床实践证明,胃旁路术后血糖可有效降低[1-3],胃旁路术是否对糖尿病有预防作用,目前尚无文献报道。本研究首先对正常大鼠行胃旁路术,术后 1 周应用经典的糖尿病模型诱导剂(streptozotocin,STZ)及高脂饮食干预制备糖尿病模型。术后常规观察大鼠进食情况、体质量变化、毛色、行为学等变化,不同时间点检测其血糖、口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、胰岛素耐量试验(ITT),分析正常大鼠行胃旁路术后其糖尿病发病率是否较正常下降,从反面验证胃旁路术对 2 型糖尿病的预防作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

取健康及分组雄性 SD 大鼠 30 只,购于川北医学院实验动物中心,体质量 180 ~ 220 g,2 个月龄,置于清洁级动物实验室饲养。每笼 5 只,自由进食、饮水。室内温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 40% ~ 70%,在光/暗周期为 12 h/12 h 的条件下饲养。将 30 只 12 周龄的雄性 SD 大鼠分为 4 组。A 组(n = 6)假手术,正常饮食;B 组(n = 8)不行手术,DM 饮食 + STZ;C 组(n = 8)行胃旁路术,正常饮食;D 组(n = 8)行胃旁路术,DM 饮食 + STZ。手术组施行 Roux-en-Y 胃旁路手术,假手术组只施行打开腹腔,空白对照组不施行任何手术。B 组、C 组、D 组动物均在同一条件下给予 STZ 诱导以及高脂饮食。该实验均按照川北医学院实验动物管理条例执行。

1.2 模型制备

Roux-en-Y 胃旁路手术按我们前期的实验方法进行[7]:术前常规禁食 24 h; 10% 的水合氯醛(0.3 g/kg)腹腔注射麻醉; 腹部常规消毒,消毒器械打开腹腔,通过纯性分离暴露胃与肠脏器;选择胃小弯侧中下 1/3 和大弯侧上中 1/3 连线作为界限离断胃部;在距 Treitz 韧带约 10 cm 处离断空肠,并且在远端空肠与近端胃进行吻合后,在近端空肠与距胃肠吻合口 10 cm 处空肠行端侧吻合术,术毕使用庆大霉素冲洗腹腔;缝合腹腔,大鼠麻醉苏醒后自由进食。

模型组实验 B、C、D 组 SD 大鼠给予 STZ 200 ng(经典的糖尿病模型诱导剂)及高脂饮食干预制备糖尿病模型。使用 2% 浓度的 STZ 溶液,按 55 mg/kg 进行单次腹腔注射。正常饮食组采用基础饲料。高脂饮食:基础饲料由大坪医院动物所提供。高脂饲料组成:基础饲料 88%、猪油 10%、胆固醇 2%、0.4% 胆酸钠等。模型鉴定标准,以血糖、肝脏病理变化等作为主要参考指标。术后每天观察各组实验动物的进食情况、体质量变化、毛色、行为学等变化,并且术前及术后不同时间点进行相应指标的检测。

1.3 动物取材形态学观察

在术后 1 个月后,取材后根据实验需要进行不同的处理与储存。石蜡切片进行形态学检测的大鼠,以 10% 水合氯醛(0.3 g/kg)麻醉,经由左心室快速灌注 0.9% 氯化钠 200 mL,再以 4% 多聚甲醛 100 mL 进行灌注。取胰腺组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中,固定 12 h 后,进行酒精脱水、透明、浸蜡处理、包埋、切片等系列处理。用于 RT-PCR、Western blot 检测的标本取材方法:在大鼠麻醉后,打开腹腔进行取材,直接保存在液氮罐中,用于后期行 RT-PCR、Western blot 等分析。石蜡切片经苏木精伊红染色后,光学显微镜下观察胰腺组织病变情况,每只动物选取 6 张切片,在高倍镜视野下观察多个视野。

1.4 检测指标

1.4.1 OGTT 大鼠在试验的前夜 22:00 开始禁食。试验当天早晨 8:00,称量大鼠体质量后经尾静脉采血 100 μl 用于测定空腹血糖。随后予以 20% 葡萄糖溶液按照 2 g/kg 体质量标准灌胃,并开始计时,于灌胃后 30、60、120 min 时分别尾静脉采血用于测定血清血糖,将各次所测得的血糖浓度与对应的时间作图,绘制糖耐量曲线。

1.4.2 ITT 每组取 5 只大鼠,术前 1 d 禁食,自由饮水 12 h。采用诺和灵 R(0.5 μl)腹腔注射。注射前、注射后 30、60、120 min 分别采取眼底静脉血,测定血清葡萄糖浓度。计算与基础血糖的比值。

1.4.3 大鼠血糖、胰岛素、GLP-1 含量测定 将大鼠尾静脉所采血室温下自然凝固 30 min,离心 10 min(50 000 r/min),收集上清液,采用 ELISA 检测,通过加样、温育、配液、洗涤、加酶、温育、洗涤、显色、终止、测定,计算出标准曲线的直线回归方程式,最终算出 Insulin、Glucagon、GLP-1 浓度。

1.5 提取 RNA 及 RT-PCR

按照我们先前的提取方法进行基因提取与扩增[7]。将所有组织加入液氮后研磨成粉,加入 Trizol RNA 裂解液(Invitrogen,USA)后,依据常规实验步骤提取总 RNA。总 RNA 用 DEPC 水稀释 100 倍后,经紫外分光光度计(NanoPhotometer,Germany)测量浓度与纯度。保证标本 A260/A280 比值为 1.8 ~ 2.0。cDNA 逆转录反应,使用 TaKaRa One Step RNA PCR 试剂盒进行实验,得到 cDAN。随后根据说明依次加入引物、Mix,去离子水,进行 PCR 扩增。引物由上海英骏生物公司合成。引物序列如下:PEPCK 上游引物为 5' AGGCCGCACCATGTATGT 3';PEPCK 下游引物为 5' GCAGTGAGTTCCCACCGTAT 3';扩增片断为 317 bp Belta actin 上游引物为 5' GTAAAGACCTCTATGCCAACA 3';Belta actin 下游引物为 5' GGACTCATCGTACTCCTGCT 3';扩增片断为 227 bp PCR 循环条件:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,40 个循环后于 72 ℃延伸 10 min。PCR 反应产物的大小分别为 317 bp(PEPCK)和227 bp(Belta actin),PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪采集图像,经 Image 软件进行灰度测定,实验重复 3 次。将 GLP-1 的灰度值与 Belta actin 灰度值的比值进行分析。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

将收集到的标本迅速放入 -80 ℃冰箱中保存备用。在实验中,使用蛋白裂解试剂盒(RIPA 蛋白裂解液,碧云天生物公司)按说明书进行裂解,随后进行考马斯亮兰 G-250 进行染色,测量蛋白浓度,并且进行定量,从标准曲线中确定待测样品的浓度。常规制胶和加放电泳液后,加入上样品进行电泳。完毕,切割取下胶条带,进行马斯亮蓝染色。同时用 PVDF 膜进行转膜、封闭 1 ~ 2 h 后,加入兔多克隆抗体 PEPCK(1∶2 000,Millipore,USA),4 ℃过夜。次日加入 HRP 二抗,室温 2 h,ECL 显色,拍照,分析。

1.7 HE 染色

将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色数分钟。酸水及氨水中分色,各数秒钟。流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻。入 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 min。入酒精伊红染色液染色 2 ~ 3 min。染色后的切片经纯酒精脱水,再经二甲苯使切片透明。将已透明的切片滴上加拿大树胶,盖上盖玻片封固。待树胶略干后镜检。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活情况

A 组大鼠无死亡发生。B、C、D 组大鼠死亡共计 1 只,因手术后 10 d 因粘连性肠梗阻死亡。

2.2 大鼠进食量

4 组大鼠术前进食量差异无统计意义($P = 0.455$, $P = 0.143$, $P = 0.707$)。手术后 3 d 进食量发生变化,存在一定差异,并且这种差异持续到术后 30 d。与 A 组相比,B 组、C 组、D 组饮食量相差明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组饮食量相差明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 C 组相比,D 组饮食量差异明显,具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 大鼠体质量的变化

4 组大鼠体质量测定都在手术前后不同时间点进行。在术前体质量差异无统计意义($P = 0.950$, $P = 0.413$, $P = 0.103$)。手术后 3 d 体质量发生轻微变化,尤其是术后 7 d 体质量差距进一步明显,持续到术后 30 d。与 A 相比,B 组、C 组、D 组体质量有明显变化,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组体质量有明显变化,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 各组进食量变化($\bar{x} \pm s$,g/d)

组别	n	术前	术后 3 d	术后 7 d	术后 10 d	术后 14 d	术后 17 d	术后 21 d	术后 24 d	术后 30 d
A 组	6	21.00 ± 0.89	22.33 ± 1.03	22.83 ± 0.75	23.17 ± 1.32	23.67 ± 1.21	24.00 ± 0.89	24.17 ± 0.75	24.00 ± 0.89	25.17 ± 0.75
B 组	8	20.66 ± 0.81	17.83 ± 0.75 *	30.00 ± 1.41 *	28.67 ± 0.51 *	28.50 ± 1.05 *	28.17 ± 0.75 *	28.33 ± 1.21 *	28.83 ± 0.75 *	29.00 ± 0.89 *
C 组	8	20.33 ± 0.51	20.66 ± 0.51 *#	21.50 ± 1.22#	22.50 ± 0.54#	23.50 ± 0.55#	24.50 ± 0.55#	24.50 ± 0.55#	24.83 ± 0.75#	25.50 ± 0.55#
D 组	8	20.83 ± 0.75	18.16 ± 0.98 *△	20.83 ± 0.98 *#	21.50 ± 1.01 *#	22.00 ± 0.89 *#	22.83 ± 0.75 *#	23.67 ± 1.03 *#	24.17 ± 0.75 *#	23.83 ± 0.75 *#

*:与 A 组比较,$P < 0.05$;#:与 B 组比较,$P < 0.05$;△:与 C 组比较,$P < 0.05$

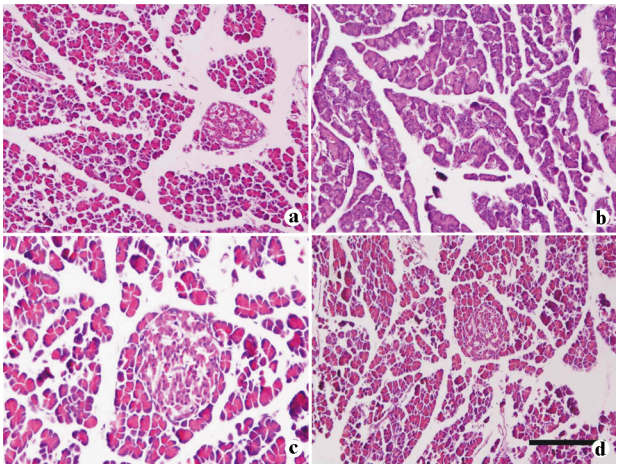
表 2 各组体质量水平变化($\bar{x} \pm s$,克/只)

组别	n	正常大鼠	术后 3 d	术后 7 d	术后 10 d	术后 14 d	术后 17 d	术后 21 d	术后 24 d	术后 30 d
A 组	6	182.67 ± 4.08	187.50 ± 6.12	207.67 ± 8.16	226.00 ± 4.04	228.33 ± 6.83	246.50 ± 6.80	260.83 ± 6.73	275.00 ± 4.24	301.00 ± 8.85
B 组	8	184.17 ± 2.04	180.67 ± 7.03	188.50 ± 10.60*	198.33 ± 13.29*	204.17 ± 8.01*	209.16 ± 16.25*	208.83 ± 9.51*	213.00 ± 6.0*	212.50 ± 11.29*
C 组	8	190.67 ± 9.66	183.33 ± 6.83#	202.83 ± 10.59#	221.67 ± 6.83#	229.16 ± 11.14#	242.33 ± 10.70#	259.66 ± 10.87#	278.66 ± 8.16#	306.33 ± 8.54#
D 组	8	190.83 ± 5.84	191.67 ± 9.83	191.33 ± 14.51*△	203.83 ± 10.20*△	200.00 ± 21.67*△	199.16 ± 12.00*△	204.67 ± 10.87*△	204.83 ± 6.55*△	199.33 ± 13.66*△

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

2.4 大鼠胰腺形态学的变化

正常胰腺与模型组 B 组、D 组胰腺明显不同。正常胰腺表现为胰岛细胞形状规则,细胞在胰岛分布一致,大小均匀,形态完整(图 1a,图 1c)。饮食 + 药物诱导组结果与此相反,形态学显示胰岛太小,有不规则轮廓和连续性。空泡变性,核浓缩和淋巴细胞浸润现象。此外,细胞的胰岛不规则形状并表现出一个凌乱的排列,而细胞结构模糊(图 1b,图 1d)。但是与行胃旁路术 + 正常饮食组相比,行胃旁路术 + DM 饮食组形态结果有所改善。



a:A 组;b:B 组;c:C 组;d:D 组

图 1 各组胰腺组织胰岛细胞形状(HE ×400)

2.5 大鼠血糖的变化

4 组大鼠术前血糖差异无统计意义($P=0.747$, $P=0.607$, $P=0.949$),术后血糖尤其是术后第 10 天变化显著。与 A 组相比,B 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$),而 C 组各时间点血糖水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$)。表明行胃旁路术后血糖显著降低,经 STZ 作用后血糖有所升高(C 组),但仍有明显的降血糖能力(见表 3)。

2.6 大鼠血清中胰岛素含量的变化

4 组大鼠术前胰岛素水平比较,差异无统计意义($P=0.093$, $P=0.426$, $P=0.093$),见表 4。手术后各时间点胰岛素水平发生明显变化,并且从第 10 d 开始差异明显。与 A 组相比,B 组、D 组胰岛素水平差异有统计学意义($P<0.05$),C 组胰岛素水平差异无明显统计学意义。与 B 组相比,C 组、D 组胰岛素水平差异有统计学意义($P<0.05$)。与 C 组相比,D 组胰岛素水平差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.7 大鼠血清中 GLP-1 含量的变化

4 组大鼠术前 GLP-1 差异无统计学意义($P=0.093$, $P=0.426$, $P=0.093$),见表 5。手术后各时间点GLP-1 发生明显变化,并且从第 10 天开始差异明显。与 A 组相比,B 组、D 组 GLP-1 表达差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组 GLP-1 差异有统计学意义($P<0.05$)。与 D 组相比,C 组 GLP-1 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.8 OGTT 试验结果

4 组大鼠经胃灌注葡萄糖后,各时间点血糖水平表现出差异。与 A 组相比,B 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 相比,C 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$)。与 C 组相比,D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

表 3 各组血糖水平变化($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	术前	术后 3 d	术后 7 d	术后 10 d	术后 14 d	术后 17 d	术后 21 d	术后 24 d	术后 30 d
A 组	6	6.13 ± 0.43	6.10 ± 0.42	6.07 ± 0.31	5.95 ± 0.16	6.57 ± 0.27	6.23 ± 0.08	6.10 ± 0.55	5.80 ± 0.09	5.70 ± 0.26
B 组	8	6.05 ± 0.53	29.72 ± 1.71*	26.50 ± 3.10*	26.88 ± 2.24*	27.00 ± 1.03*	27.22 ± 1.91*	27.82 ± 1.63*	28.15 ± 1.58*	28.70 ± 1.99*
C 组	8	6.00 ± 0.50	6.18 ± 0.47#	5.75 ± 0.35#	6.73 ± 1.11#	6.15 ± 0.29#	6.87 ± 1.11#	5.50 ± 0.89#	6.25 ± 1.54#	6.35 ± 0.50#
D 组	8	6.15 ± 0.25	25.00 ± 3.45*#△	21.90 ± 3.33*#△	20.73 ± 2.34*#△	19.55 ± 1.22*#△	18.62 ± 1.31*#△	17.30 ± 0.92*#△	16.87 ± 1.01*#△	15.78 ± 0.94*#△

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

表 4 组胰岛素水平变化($\bar{x} \pm s$,mIU/L)

组别	n	正常大鼠	术后 1 d	术后 10 d	术后 20 d	术后 30 d
A 组	6	24.15 ± 1.40	23.77 ± 1.83	23.93 ± 1.95	24.72 ± 1.51	25.27 ± 0.94
B 组	8	23.07 ± 1.09	22.60 ± 0.71	28.37 ± 1.12 *	39.57 ± 1.12 *	48.03 ± 1.59 *
C 组	8	23.65 ± 0.72	23.93 ± 1.37	23.90 ± 1.28 #	24.22 ± 2.20 #	25.52 ± 0.89 #
D 组	8	23.07 ± 0.93	23.57 ± 1.05	27.67 ± 0.71 *#	27.00 ± 0.86 *#	26.43 ± 0.88 *#

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较, $P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

表 5 对照组和各处理组 GLP 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	正常大鼠	术后 1 d	术后 10 d	术后 20 d	术后 30 d
A 组	6	46.35 ± 0.69	45.07 ± 1.23	45.83 ± 1.07	45.98 ± 0.74	46.08 ± 0.52
B 组	8	47.13 ± 0.36	43.65 ± 0.65	37.30 ± 1.06	26.72 ± 0.53	16.60 ± 0.94
C 组	8	44.85 ± 0.35	44.63 ± 1.43	45.97 ± 0.74 #	46.02 ± 1.26 #	46.07 ± 1.13 #
D 组	8	47.15 ± 0.26	41.45 ± 1.44	31.80 ± 2.20 *#△	22.50 ± 1.80 *#△	14.23 ± 0.81 *#△

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

表 6 OGTT 试验各组各时间点血糖水平变化($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	0 min	30 min	60 min	120 min
A 组	6	4.53 ± 0.45	6.72 ± 0.35	5.43 ± 0.53	4.58 ± 0.37
B 组	8	18.77 ± 1.13	30.25 ± 1.78 *	27.08 ± 0.80 *	20.77 ± 1.39 *
C 组	8	4.52 ± 1.13	7.07 ± 0.16	5.55 ± 0.39	4.57 ± 0.21
D 组	8	12.63 ± 0.95	25.33 ± 0.76 *	20.02 ± 0.68 *	15.23 ± 1.31 *

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

2.9 ITT 试验结果

4 组大鼠采用诺和灵 R 腹腔镜注射后,各时间点血糖水平均表现出现差异。与 A 组相比,B 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组各时间点血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$)。与 C 组相比,D 组血糖水平差异有统计学意义($P<0.05$),见表 7。

表 7 ITT 试验各组各时间点血糖水平变化($\bar{x} \pm s$,)

组别	n	0 min	30 min	60 min	120 min
A 组	6	3.77 ± 0.22	2.18 ± 0.15	2.12 ± 0.16	2.23 ± 0.15
B 组	8	16.70 ± 0.73	16.42 ± 0.47	15.85 ± 0.95	15.08 ± 0.80
C 组	8	3.97 ± 0.78	2.42 ± 0.30	2.13 ± 0.26	2.18 ± 0.34
D 组	8	10.45 ± 0.44	10.38 ± 0.66	8.97 ± 0.42 *	8.53 ± 0.70 *

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$

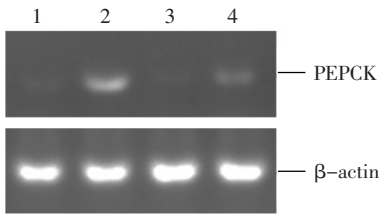
2.10 PEPCK mRNA 表达水平

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)是糖异生的关键酶 PEPCK,可以作为衡量糖尿病的重要指标。从 RT-PCR 电泳图结果中可见,PEPCK 条带在 317 bp 范围,与预测条带大小一致(图 2)。与 A 组相比,B 组、D 组 PEPCK mRNA 表达量明显增加,提示血糖明显上升($P<0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组 PEPCK mRNA 表达明显低于 B 组,差异有统计学意义,提示胃旁路术可较强的抑制 PEPCK 的表达($P<0.05$)。与 C 组相比,D 组 PEPCK mRNA 表达明显增加且差异有统计学意义($P<0.05$),提示旁路术对 PEPCK 的抑制作用可能被 STZ 取消部分。

表 8 各组 PEPCK mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA expression
A 组	6	0.13 ± 0.04
B 组	8	0.64 ± 0.08 *
C 组	8	0.16 ± 0.05 #
D 组	8	0.35 ± 0.07 *#△

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 C 组比较,$P<0.05$



1:A 组;2:B 组;3:C 组;4:D 组

图 2 各组 PEPCK 的 mRNA 表达

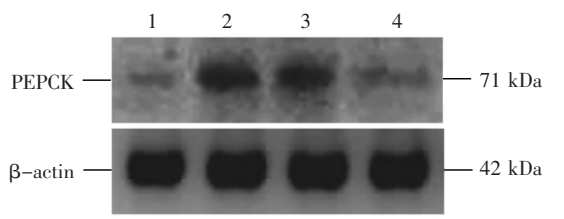
2.11 PEPCK 蛋白表达水平

由图 3 可见,PEPCK 分子量为 71 kDa。与 A 组相比,B 组、D 组 PEPCK 蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 相比,C 组、D 组 PEPCK 蛋白差异有统计学意义($P<0.05$)。与 C 组相比,D 组 PEPCK 蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 9 各组 PEPCK 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白表达
A 组	6	0.11 ± 0.02
B 组	8	0.66 ± 0.06 *
C 组	8	0.18 ± 0.09 #
D 组	8	0.37 ± 0.09 *#△

*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 B 组比较,$P<0.05$;△:与 D 组比较,$P<0.05$



1:A 组;2:B 组;3:C 组;4:D 组

图 3 对照组和各处理组 PEPCK 的蛋白表达

3 讨论

糖尿病是一组胰岛素分泌缺陷和作用缺陷导致的以慢性血糖水平增高为特征的代谢异常综合征,导致碳水化合物、蛋白质、脂肪、以及水合电解质代谢的紊乱[8]。传统的 2 型糖尿病内科治疗往往需要严格饮食控制,终生服药或者注射胰岛素,血糖很难控制在正常水平[9]。近来,在治疗肥胖与非肥胖糖尿病过程中发现 Roux-en-Y 胃旁路术具有很好的降糖治疗作用[2]。目前,关于正常大鼠行胃旁路术后诱导糖尿病模型,血糖相关指标是否发生变化尚未见相关报道。本研究首先对正常大鼠行胃旁路术,术后应用 STZ(经典的糖尿病模型诱导剂)及高脂饮食干预制备糖尿病模型。观察大鼠术后进食情况、体质量变化等规律,通过进一步检测血糖等相关指标,从反面验证胃旁路术对糖尿病的预防作用。

应用脂肪含量一般在 30% 左右的高脂饲料喂养后再辅以小剂量的 STZ(STZ 剂量在 200 mg)诱导的 2 型糖尿病模型,能够较好地评价治疗 2 型糖尿病的药物以及进行 2 型糖尿病病理机理和糖尿病并发症相关方面的研究, 高脂饮食 + STZ 诱导 2 型糖尿病模型是一种常见的方法[10]。我们的模型经过病理以及相关指标检测显示成功制备了 DM 模型。而大鼠行胃旁路术后,大鼠进食情况、体质量变化、毛色、行为学等变化,不同时间点检测其血糖、OGTT、ITT 试验都显示了模型成功。本实验结果发现,RYGB 术饮食量发生变化,可能影响体质量的变化。但是是否 RYGB 术通过减轻体质量达到影响血糖的作用,对于 RYGB 术这种治疗效果我们有 2 种可能的争议推测:①手术后本身引起体质量减轻,会影响血糖的下降。体质量可以作为糖尿病死亡率的重要影响因子,体质量增减与血糖有一定的相关性,减轻体质量后血糖会明显减缓。对于许多人来说,在明显的体质量减轻之前,糖尿病血糖会在体质量减轻前就已经减缓[11-12]。②可能通过减少了脂肪量或热量起作用。另有证据显示,糖尿病不会在其他的外科手术后的相同程度的热量减少的情况下减缓,吸脂术或大网膜脂肪切除手术也是一样[13-14]。同时我们的实验证据也发现,降糖作用在制备糖尿病模型后 3 d 就表现出疗效,所以也不能成为体质量减轻导致降糖的主要依据。因此,我们认为 RYGB 体质量减轻并非是引起糖尿病减缓的主要因素。我们的结果进一步提示,术后对大鼠模型的血糖有明显降低作用后血糖即明显升高,胰岛素、OGTT 试验、胰高血糖素样肽-1、ITT 试验在不同时间段都有明显变化,可能手术对这些指标有明确的影响,但是具体的机制仍然需要更多的论证。

另外,近年来多种证据说明糖尿病患者 RYGB 术后血糖降低的作用有多种因素参与。如血液循环中胃肠激素水平的特殊改变可能是 RYGB 术作用的重要体现。RYGB 术后脑肠肽、人多肽 YY 和 GLP-1 都会发生改变,而这些激素对体质量下降的维持,以及对葡萄糖耐受性的改善都起着重要的作用[15-16]。在哺乳动物中,外周组织摄取和肝脏所分泌的葡萄糖之间的平衡是维护一定范围葡萄糖水平的重要因素。任何外界影响血糖的因素可能都会使循环胰高血糖素水平增加,从而诱导通过 CREB/TORC 通路的 PGC-1α 基因表达[17],并且诱导出的 PGC-1α 刺激 PEPCK 和葡萄糖-6-磷酸酶基因的表达[18]。目前研究证明,PEPCK1 在糖尿病啮齿类动物模型中明显上调[18]。肝脏在维持机体血糖稳定中起重要作用,肝脏内生糖明显增加是 2 型糖尿病空腹血糖升高的主要原因[7]。在糖异生中,PEPCK 同时使脱羧和磷酸化草酰乙酸,使其变成磷酸,是糖异生中最早的,也限速的一个步骤[18]。另外我们先前的研究也证明,RYGB 可有效降低糖尿病大鼠 PEPCK 的表达[7]。实验进一步发现,RYGB 术后制备糖尿病模型过程中,PEPCK 与其他组相比,表达水平明显偏低。因此,我们分析,PEPCK 术对血糖的预防作用也可能涉及到肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的重要功能。

总之,本研究通过建立正常大鼠(SD 大鼠)的胃旁路术动物模型,观察到可以有效降低通糖尿病模型大鼠的血糖、胰岛素、GLP-1 以及 PEPCK 等的变化,从反面论证胃旁路术的降糖作用和机制,为研究胃旁路术降低糖机制提供了一种全新的思路和方法。但是胃旁路术降低糖作用机制仍然需要更多的探索和论证,如胰岛素敏感性、β 细胞功能,以及其他的一些在 RYGB 后改善代谢的潜在新机制并未全部清楚,这些问题的解决对于揭示糖尿病病理本质以及寻找新的靶向药物具有重要意义。

[参考文献]

[1] Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects[J]. N Engl J Med, 2007, 357(8): 741 – 752.

[2] Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Med, 2009, 122(3): 248 – 256.

[3] Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Med, 2009, 122(3): 248 – 256.

丹参预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的作用及对 Bcl-2 表达的影响

程 辉,孙兆霞,宋育泽 (山东万杰医学院解剖教研室,山东 淄博 255213)

[摘 要] **目的** 探讨大鼠视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)过程中,丹参对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用以及对 Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 随机选取 132 只 Wistar 大鼠,分为正常对照组、缺血再灌注组、丹参预处理组,通过对前房加压制作视网膜缺血再灌注损伤模型,后 2 组再各根据不同的缺血再灌注时间(6 h、12 h、24 h、48 h、72 h)分为 5 个亚组。HE 染色观察其视网膜组织学变化,SABC 法和 Western-blot 法检测 Bcl-2 蛋白表达的变化。**结果** Bcl-2 蛋白在正常组表达较弱,在缺血再灌注组和丹参预处理组缺血再灌注 6 h 后开始表达,24 h 后显著增强,48 h 后下降,72 h 后表达减弱,变化趋势基本一致。但是 2 组比较,丹参预处理组在不同时间点 Bcl-2 蛋白的表达均明显强于缺血再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 丹参预处理对视网膜缺血再灌注损伤可以通过减少神经节细胞的凋亡起到保护作用,其作用机制可能是通过调节 Bcl-2 蛋白的表达来实现。

[关键词] 丹参;视网膜缺血再灌注损伤;Bcl-2
[中图分类号] R322.9+1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)01-0017-04

Protective effect and Bcl-2 expression of salvia pretreatment on retinal ischemia-reperfusion injury

CHENG Hui, SUN Zhao-xia, SONG Yu-ze (Teaching and Research Section of Anatomy, Wanjie Medical College, Zibo Shandong 255213, China)

Abstract: Objective To study the protective effect and Bcl-2 expression of salvia pretreatment on retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI). **Methods** One hundred and thirty two Wistar rats were randomly divided into the normal control group, the ischemia-reperfusion group and the salvia pretreatment group. The model of retinal ischemia-reperfusion injury was constructed by increasing the intraocular pressure. The ischemia-reperfusion and salvia pretreatment group were divided into five subgroups according to the different reperfusion time (6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h). 0bserve the histological changes in retina by HE staining. The SABC (strept avidin-biotin complex) and

doi:10.11659/jjssx.04E015052
[基金项目] 山东万杰医学院校级课题(X13ZK16)
[收稿日期] 2015-09-28 [修回日期] 2015-11-15

[4] Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, et al. Effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Surg, 2003,38(4):467-484.
[5] Pok EH, Lee WJ. Gastrointestinal metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14315-14328.
[6] Sham JG, Simianu VV, Wright AS, et al. Evaluating the mechanisms of improved glucose homeostasis after bariatric surgery in Ossabaw miniature swine[J]. J Diabetes Res, 2014. Article ID 526972. doi:10.1155/2014/526972.
[7] 谢杰斌,蔡景理,李立军,等. 胃旁路术对 2 型糖尿病大鼠肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 mRNA 表达的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2012,15(11):1146-1149.
[8] 李艳君,濮继红,李艳萍,等. ASS 对实验性Ⅱ型糖尿病大鼠胰岛素和 C 肽分泌作用研究[J]. 局解手术学杂志,2002,11(1):21-22.
[9] Elizarova S, Galstyan GR, Wolffenbuttel BH. Role of premixed insulin analogues in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: a narrative review[J]. J Diabetes, 2014,6(2):100-110.
[10] Thompson CS, Mikhailidis DP. Insulin resistance and mechanical dysfunction in hearts of Wistar rats with streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 1993,36(9):880-881.
[11] Patil MA, Suryanarayana P, Putcha UK, et al. Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014:463264.
[12] Goldfine AB, Patti ME. Diabetes improvement following Roux-en-Y gastric bypass: understanding dynamic changes in insulin secretion and action[J]. Diabetes, 2014,63(5):1454-1456.
[13] Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, et al. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Surg, 2003,238(4):467-484.
[14] Picot J, Jones J, Colquitt JL, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation[J]. Health Technol Assess, 2009, 13(41):1-190.
[15] Conroy R, Febres G, McMahon DJ, et al. Recombinant human leptin does not alter gut hormone levels after gastric bypass but may attenuate sweet cravings[J]. Int J Endocrinol, 2014, 2014:120286-120294.
[16] Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, et al. Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects[J]. Obes Surg, 2012,22(7):1084-1096.
[17] Herzig S, Long F, Jhala US, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1[J]. Nature, 2001,413(6852):179-183.
[18] Xue Y, Shen L, Cui Y, et al. Tff3, as a novel peptide, regulates hepatic glucose metabolism[J]. PLoS One, 2013,8(9):e75240.

(编辑:左艳芳)