消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000960

Roux-en-Y胃转流术对肥胖大鼠肝脏糖原含量及 Gsk-3β/Gs 的影响

母　松[1],刘佳雨[2],郭　伟[1],张书平[2],汪志红[2],张　军[1]
(1. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆　400016;2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨 Roux-en-Y 胃转流术(Roux-en-Y gastric bypass,RYGB)对肥胖大鼠肝脏糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β,Gsk-3β)及糖原合成酶(glycogen synthase,Gs)表达的影响。**方法**:SD 大鼠 70 只,随机选取 60 只高脂饲料喂养建立肥胖大鼠模型,其余作为正常对照组(Con 组,n=10),肥胖造模成功大鼠共计 26 只,按干预方式不同将肥胖大鼠分为肥胖组(n=8)、RYGB 手术组(Ob+RYGB 组,n=10)和假手术组(Ob+Sham 组,n=8)。检测各组大鼠空腹血糖和血清胰岛素水平,葡萄糖耐量实验(glucose insulin tolerance tests,GTT)、胰岛素耐量实验(insulin tolerance tests,ITT)测定各组糖耐量及胰岛素耐量情况,PAS 染色检测肝脏组织糖原沉积情况,荧光定量 PCR 和 Western blot 检测肝组织 Gsk-3β 和 Gs mRNA 及蛋白表达情况。**结果**:排除死亡后每组成功建模量分别为 9、8、7、7 只,与正常对照组比较,Ob 组、Ob+Sham 组大鼠体质量、空腹血糖、血浆胰岛素、胰岛素抵抗指数、GTT、ITT 曲线下面积明显升高(P<0.05),肝脏组织糖原沉积明显减少,Gsk-3β 表达明显上调(P<0.05),而 Gs表达明显下调(P<0.05);与 Ob 组和 Ob+Sham 组比较,Ob+RYGB 大鼠体质量、空腹血糖、血清胰岛素、胰岛素抵抗指数、GTT、ITT 曲线下面积明显下降(P<0.05),肝脏组织糖原沉积明显增加,Gsk-3β 表达明显下调(P<0.05),Gs 表达明显上调(P<0.05)。**结论**:RYGB 手术可改善肥胖大鼠肝脏糖原合成代谢紊乱,其机制可能与其上调肝脏 Gsk-3β 和下调 Gs 蛋白的表达有关。

【关键词】肥胖;Roux-en-Y 胃转流术;肝脏糖原合成;糖原合成酶激酶-3β;糖原合成酶
【中图分类号】R589.1　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-01-28

Effects of Roux-en-Y gastric bypass on liver glycogen content and expression of Gsk-3β/Gs in obese rats

Mu Song[1], Liu jiayu[2], Guo Wei[1], Zhang Shuping[1], Wang Zhihong[2], Zhang Jun[1]
(1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Roux-en-Y gastric bypass(RYGB) on glycogen synthase kinase-3β(Gsk-3β) and glycogen synthase(Gs), and to explore the mechanism of improving hepatic glycogen synthesis in obese rats. ***Methods***: Sixty SD rats randomly chosen from 70 rats were fed with high-fat diet(HFD), and the left 10 rats which fed with standardized diet were used as normal control group(n=10). Twenty-six rats in the HFD group having body weight at least 20% more than those in normal control rats were subdivided into three groups: obese group(Ob group, n=8), obese RYGB group(Ob+RYGB group, n=10), obese sham operation group(Ob+sham group, n=8). Intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests(GTT and ITT) were performed after surgery. Hepatic glycogen deposition was observed using periodic acid schiff(PAS) staining. The mRNA levels and protein levels of Gsk-3β and Gs were examined with quantitative RT-PCR and Western blot respectively. Fasting blood glucose(FBG) and plasma levels of insulin also were tested at 8 week after surgery. ***Results***: The number of rats in each group after successful modeling was 9, 8, 7 and 7, respectively. Compared with those in control group, the level of body weight, FBG, plasma insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance, the area under curve of GTT and ITT were significantly increased (P<0.05), hepatic glycogen content was decreased obviously, the expression of Gsk-3β were significantly increased(P<0.05), and the expression of Gs were significantly decreased(P<0.05) in Ob group and Ob+Sham group, which were dramatically reversed by RYGB treatment(P<0.05). ***Conclusion***: RYGB can significantly promote hepatic glycogen synthesis in obese rats, which may be related to the inhibition of Gsk-3β and improvement of Gs expression.

【Key words】obesity; Roux-en-Y gastric bypass; hepatic glycogen synthesis; glycogen synthase kinase-3β(Gsk-3β); glycogen synthase(Gs)

作者介绍:母　松,Email:717441558@qq.com,
研究方向:肥胖症及相关并发症手术治疗。
通信作者:张　军,Email:zjun2323@ sina.cn。
基金项目:重庆市科技攻关应用技术研发资助项目(编号:CSTC2012gg-yyjs10038)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1604.066.html (2016-05-13)

肥胖症目前已经成为世界广泛流行的一种代谢性疾病，其发病率呈逐年增长趋势，一项系统性调查研究表明，2013 年全球超过 30%的人口表现出超重或者肥胖[1]，截止 2010 年，我国 18 岁及以上人群超重和肥胖总率为 42.6%，约占世界肥胖人群的五分之一[2]。肥胖症常伴随多种相关并发症，研究显示，44%的糖尿病，23%的缺血性心脏病和某些癌症负担 7%~41%归因于超重和肥胖[3]。肝脏糖原合成作用作为机体对胰岛素效应的一种方式，能够将血液中葡萄糖分子聚合并存储能量，降低血糖。研究表明，肝糖原储备下降参与了肥胖和 2 型糖尿病（type 2 diabetes，T2DM）糖代谢紊乱的发生、发展[4]。肝糖原合成降低是肝脏清除葡萄糖能力降低的重要原因之一，并与糖原合成激酶-3/糖原合成酶（glycogen synthase kinase-3β，Gsk-3β/glycogen synthase，Gs）失调密切相关[5-7]。Roux-en-Y 胃转流术（Roux-en-Y gastric bypass，RYGB）作为肥胖症和 T2MD 患者的治疗手段之一，被认为是治疗 T2MD 糖代谢紊乱的有效手段[8]。但具体机制尚不明确。已有研究显示 RYGB 手术能够显著降低 T2DM 大鼠的肝糖输出，增加肝脏糖原含量，改善肝脏胰岛素抵抗状态[9-10]。但在单纯肥胖引起的糖代谢紊乱中，RYGB 是否影响肝脏糖原合成过程及其中相关内在调控机制，国内外尚少见报道。本实验拟通过对肥胖大鼠行 RYGB 手术建立肥胖大鼠胃转流手术模型，观察手术对肥胖大鼠肝脏糖原沉积及肝脏糖原合成相关因子 Gsk-3β、Gs 表达的影响。为进一步防治肥胖及相关糖代谢紊乱的临床策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级 4 周龄雄性 SD 大鼠 70 只，体质量（101 ± 12）g，由重庆医科大学动物实验中心[动物许可证 SCXK（渝）2012-0001]提供；动物饲养于 SPF 级动物房，恒定光照 12 h，恒定温度 20 ℃~25 ℃，相对湿度 60%，分笼喂养，给予充足食物和饮水。本研究得到作者所在单位实验动物伦理委员会的审查批准。动物适应性喂养 1 周。按照随机数表法将大鼠分为正常对照组（10 只）和高脂组（60 只），正常组采用普食喂养（能量及来源：蛋白质 18.3%，脂肪 20.8%，碳水化合物60.9%），高脂组采用高脂饲料喂养（能量及来源：蛋白质 12.8%，脂肪 51.9%，碳水化合物 35.3%）。凡经过高脂饲料喂养 12 周后，SD 大鼠体质量超过普食组大鼠体质量的 20%作为实验肥胖大鼠[11]。成功建模肥胖大鼠 26 只，按随机数字表法分为 3 组：高脂肥胖组（Ob 组，8 只）、RYGB 手术组（Ob+RYGB 组，10 只）和假手术组（Ob+Sham 组，8 只）。在造模过程中，普食组因病死亡 1 只，高脂组因病死亡 2 只，RYGB 手术后死亡 3 只，假手术死亡 1 只。所有大鼠在造模期间自由摄食和饮水，饲料和水每日更换 1 次。

1.2 主要试剂盒仪器

兔抗大鼠 Gsk-3β 单克隆抗体（Cell Signal Technology 公司，美国），Gs 兔抗大鼠多克隆抗体（Abcam 公司，英国），β-actin 抗体和二抗（武汉三鹰生物技术有限公司，中国），荧光定量 PCR 相关试剂及引物（Takara 公司，日本），Western blot 相关试剂（碧云天生物技术研究所，中国），胰岛素酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（Assay Biotech 公司，美国），PAS 染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，中国），便携式血糖仪（罗氏公司，德国）。

1.3 手术方法

RYGB 手术方法[12]：术前禁食 12 h 以上，禁饮 4 h，给予戊巴比妥钠 1 ml/kg，腹腔内注射麻醉，将大鼠仰卧固定，取腹部正中切口 2~3 cm，找到胃食管连接处，分离游离出贲门部，离断胃食管端，保留约 5%胃容积，封闭胃远端，食管端待吻合。然后在 Treitz 韧带远端 8 cm 切断空肠，远端空肠襻与食管端行端端吻合，在距此吻合口 12 cm 处开一侧口与近端空肠断端行端侧吻合。以上的操作均用 6-0 丝线完成，用温生理盐水冲洗腹腔，4-0 丝线逐层关腹。术后，适量皮下补液，置大鼠于恒温笼中，禁食 1 d，牛奶自由饮用 2 d，面包等软食 1 d 之后过渡到正常饮食，均衡控制每组进食总量。假手术组按 RYGB 手术组相同解剖部位行原位切开缝合，并维持总手术时间接近于 RYGB 胃转流术。于术后 5 周末和 6 周末，分别实施 GTT 和 ITT。术后 8 周末检测空腹血糖及血清胰岛素水平，然后将大鼠深度麻醉加高浓度二氧化碳窒息后处死，取新鲜肝脏组织-80 ℃ 冰箱保存，以备 Western blot 和 PCR 等分析。

1.4 主要方法

1.4.1 葡萄糖耐量实验（glucose tolerance test，GTT） 术后 5 周末，各组大鼠禁食 16 h，自由饮水，测定空腹血糖，记为 0 min 时点血糖值，然后按 2 g/kg 经腹腔注射葡萄糖，分别于 15、30、60、120 min 测定血糖水平。单位以 mmol/L 表示。

1.4.2 胰岛素耐量实验（insulin tolerance test，ITT） 术后 6 周末，各组大鼠禁食 4 h 自由饮水，测定空腹血糖，记为 0 min 时点血糖值；然后按 1 U/kg 剂量经腹腔注射胰岛素，分别于 30、60、90、120 min 测定血糖水平。

1.4.3 PAS 染色 各组大鼠在术后 8 周处死后，取肝脏组织制作石蜡切片（5 μm），常规脱蜡至水，样本按照试剂盒说明

书依次经高碘酸液、Schiff 染液、Mayer 苏木精等处理，常规脱水，二甲苯透明后封片，倒置显微镜镜检显示肝糖原。每组随机取 3 张切片，每张切片取非连续的 3 个视野取值，在 200 倍视野下，采用 Image-Pro Plus 16.0 图像测量分析软件自动测定胞浆染为紫红色颗粒的阳性面积所占的百分比值。

1.4.4 ELISA 法检测空腹血浆胰岛素水平及稳态模型(homeostasis model assessment of insulin resistance，HOMA-IR)值 各组大鼠禁食 12 h，乙醚麻醉后取内眦静脉血约 2 ml，静置，4 ℃，3 000 转离心后吸取上清液置于-20 ℃冰箱中待测。样品按照胰岛素酶联免疫吸附测定试剂盒使用说明书操作，在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(absorbance，A)值，根据标准曲线的直线回归方程计算出对应的样品浓度。稳态模型评估胰岛素抵抗指数，HOMA-IR=(FINS×FPG)/22.5[13]。

1.4.5 qRT-PCR 检测 Gsk-3β 和 Gs mRNA 的含量 按照 Trizol 法提取肝组织总 RNA，逆转录为 cDNA。Gsk-3β、Gs 表达水平采用 SYBR Green 法检测，每个样本重复 3 次。Gsk-3β 的引物序列为：上游引物 5'- CCTGCCCTCTTCAACTTTA-CCA-3'，下游引物 5'-TGTCCACGGTCTCCAGCATTA-3'；Gs 的引物序列为：上游引物 5'-GAAGAGTTTGTCCGAGGCTG-TC-3'，下游引物 5'-TGAAACACCCGAAACCAGAGAG-3'；GAPDH的引物序列为：上游引物 5'-GCTGAGTATGTCGTG-GAG-3'，下游引物 5'-TCT TCTGAGTGGCAGTGAT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta G}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量：ΔC_t 表示目的基因 C_t 值减去内参基因 GAPDH 的 C_t 值，$\Delta\Delta C_t$ 表示实验组 ΔC_t 值减去正常对照组 ΔC_t 值，$2^{-\Delta\Delta G}$ 值则表示实验组目的基因 mRNA 表达量相对于正常对照组目的基因 mRNA 表达量变化的倍数。

1.4.6 蛋白质提取和 Western blot 测定大鼠肝脏 Gsk-3β 和 Gs 蛋白表达量 按照小量组织蛋白提取试剂盒要求提取新鲜肝脏组织总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，并将样本调整至相同蛋白浓度，取 10 μl 相同总量蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离，转膜至 PVDF 膜，封闭，4 ℃ 孵育兔抗大鼠 Gsk-3β(1:1 000 稀释)、兔抗大鼠 Gs(1:500 稀释)、鼠抗 β-actin (1:5 000 稀释)，4 ℃ 孵育过夜，洗膜后室温孵育 HRP 标记的二抗 1 h，显影成像，通过 Quantity one 软件分析各条带灰度值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用单因素方差分析及重复测量方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 术前术后各组大鼠体质量

测定 RYGB 术前和术后 8 周各组大鼠体质量，表 1 结果显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组术前体质量分别为(396.90 ± 43.16)、(508.40 ± 22.37)、(507.70 ± 28.94)和(503.93 ± 49.11) g；术后 8 周体质量分别为(464.80 ± 48.63)、(589.10 ± 46.51)、(451.70 ± 42.08)和(574.93 ± 52.24) g。4 组大鼠经 SPSS 19.0 统计分析得到术前体质量(F=20.352，P=0.000)，术后 8 周体质量(F=13.739，P=0.000)，差异具有统计学意义。两两比较术前后各组大鼠体质量结果显示：Ob 组，Ob+RYGB 组，Ob+Sham 组术前体质量较正常对照组明显增加(P=0.000)，Ob+RYGB 组，Ob+Sham 组与 Ob 组及 Ob+RYGB 组与 Ob+Sham 组之间差异无统计学意义(分别为 P=0.706、P=0.580、P=0.832)；术后 8 周，Ob 组、Ob+Sham 组体质量较正常对照组明显增加(P=0.000、P=0.001)，Ob+RYGB 组体质量较 Ob 组、Ob+Sham 组明显减少(P=0.000)，而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异(P=0.639)。见表 1。

2.2 各组大鼠术后 GTT 检测结果

术后 5 周 ipGTT 结果显示正常对照组腹腔注射 50%葡萄糖后在 15、30、60 min 处血糖明显低于 Ob 组、Ob+Sham 组(图 1A，P<0.01)；Ob+RYGB 组大鼠腹腔注射 50%葡萄糖后在 15、30、60 min 处血糖明显低于 Ob 组、Ob+Sham 组(图1A，P<0.05)；表 1 显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组 ipGTT 曲线下面积分别为(1 114.30 ± 115.64)、(1 485.20 ± 173.30)、(1 215.40 ± 132.90)和(1 505.80 ± 116.52)。4 组大鼠 ipGTT 曲线下面积差异具有统计意义(F=10.241，P=0.001)。组

表 1 检测各组大鼠造模体质量、血糖、血浆胰岛素及 HOMA-IR 情况（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Body weight，FBG，plasma insulin and HOMA-IR of rats in each group（$\bar{x} \pm s$）

指标	正常对照组（n=9）	Ob组(n=8)	Ob+RYGB 组（n=7）	Ob+Sham组（n=7）	F 值	P 值
术前体质量（g）	396.90 ± 43.16	508.40 ± 22.37[a]	507.70 ± 28.94[bc]	503.93 ± 49.11[a]	20.352	0.000
术后 8 周体质量	464.80 ± 48.63	589.10 ± 46.51[a]	451.70 ± 42.08[bc]	574.93 ± 52.24[a]	13.739	0.000
AUC of GTT	1 114.30 ± 115.64	1 485.20 ± 173.30[a]	1 215.40 ± 132.90[bc]	1 505.80 ± 116.52[a]	10.241	0.001
AUC of ITT	418.22 ± 36.12	559.54 ± 81.20[a]	414.80 ± 21.60[bc]	512.90 ± 27.22[a]	11.298	0.000
FBG(mmol/L)	5.15 ± 0.43	5.93 ± 0.38[a]	5.05 ± 0.22[abc]	5.78 ± 0.34[a]	9.570	0.000
Insulin(ng/mL)	0.85 ± 0.09	1.09 ± 0.08[a]	0.90 ± 0.09[bc]	1.07 ± 0.15[a]	7.288	0.002
HOMA-IR	8.89 ± 1.05	13.12 ± 1.39[a]	9.16 ± 1.18[bc]	12.45 ± 1.43[a]	17.749	0.000

注：a，与正常对照组比较 P<0.01；b：与肥胖组比较 P<0.01；c：与假手术组比较 P<0.05

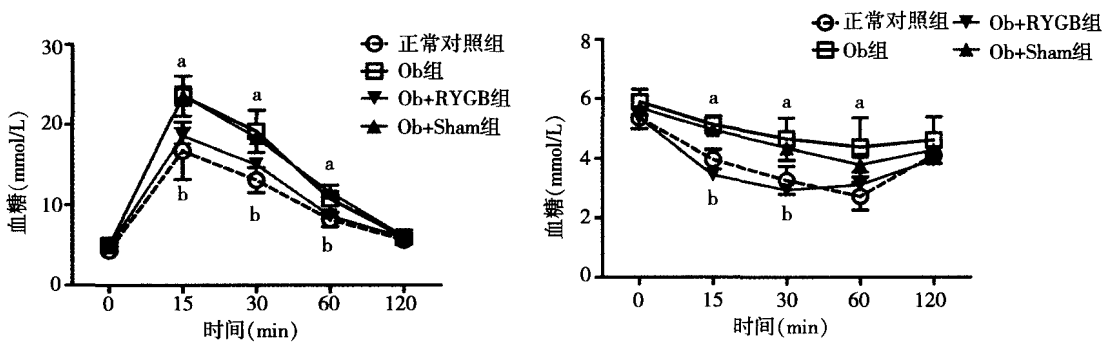
间两两比较 ipGTT 曲线下面积结果显示：Ob 组与 Ob+Sham 组 ipGTT 曲线下面积均较正常组明显增加（P=0.001、P=0.000），Ob+RYGB 组 ipGTT 曲线下面积较 Ob 组、Ob+Sham 组明显降低（P=0.007、P=0.004），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.259）。见图 1，表 1、2。

2.3　各组大鼠术后 ITT 检测结果

术后 6 周 ipITT 结果显示正常对照组大鼠腹腔注射胰岛素后在 30、60、90 min 处血糖明显低于 Ob 组、Ob+Sham 组（图 1B，P<0.01）；Ob+RYGB 组大鼠腹腔注射胰岛素后在30、60、90 min 处血糖明显低于 Ob 组、Ob+Sham 组（图 1B，P<0.05）；表 1 显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组 ipITT 曲线下面积分别为（418.22 ± 36.12）、（559.54 ± 81.20）、（414.80 ± 21.60）和（512.90 ± 27.22）。4 组大鼠 ipITT 曲线下面积差异具有统计意义（F=11.298，P=0.000）。组间两两比较 ipITT 曲线下面积结果显示：Ob 组与 Ob+Sham 组 ipITT 曲线下面积均较正常组明显增加（P=0.000、P=0.006），Ob+RYGB组 ipITT 曲线下面积较 Ob 组、Ob+Sham 组明显降低（P=0.000、P=0.005），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.910）。见图 1，表 1、2。

2.4　术后各组大鼠 FBG、血浆胰岛素及 HOMA-IR 结果

术后 8 周测定各组 FBG、血浆胰岛素及 HOMA-IR 结果，表 1 显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组 FBG 分别为（5.15 ± 0.43）、（5.93 ± 0.38）、（5.05 ± 0.22）和（5.78 ± 0.34）mmol/L；血浆胰岛素水平分别为（0.85±0.09）、（1.09 ± 0.08）、（0.90 ± 0.09）和（1.07 ± 0.15）ng/ml；HOMA-IR 指数分别为（8.89 ± 1.05）、（13.12 ± 1.39）、（9.16 ± 1.18）和（12.45 ± 1.43）。4 组大鼠经 SPSS19.0 统计分析得到 FBG（F=9.570，P=0.000），胰岛素（F=7.288，P=0.002），HOMA-IR（F=17.749，P=0.000），差异具有统计学意义。两两比较 FBG 结果显示：Ob组与 Ob+Sham 组空腹血糖水平均较正常组明显增加（P=0.001、P=0.005），Ob+RYGB 组空腹血糖水平较 Ob 组、Ob+Sham 组明显降低（P=0.000、P=0.002），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.628）；两两比较各组空腹血浆胰岛素水平结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组大鼠空腹血浆胰岛素水平均较正常组明显增加（P=0.001、P=0.003），Ob+RYGB 组空腹血浆胰岛素水平较 Ob 组、Ob+Sham 组明显减少（P=0.005、P=



A. GTT 血糖时间曲线　　B. ITT 血糖时间曲线

a：P<0.05，与正常对照组比较；b：P <0.05，与 Ob 组、Ob+Sham 组比较

图 1　术后各组大鼠 GTT 和 ITT 结果

Fig.1　Results of GTT and ITT in rats after surgery

表 2　各组大鼠 GTT、ITT 结果（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2　Results of GTT, ITT in each group（$\bar{x} \pm s$）

时间	GTT血糖（mmol/L）				ITT血糖（mmol/L）			
	正常对照组（n=9）	Ob组（n=8）	Ob+RYGB 组（n=7）	Ob+Sham组（n=7）	正常对照组（n=9）	Ob组（n=8）	Ob+RYGB组（n=7）	Ob+Sham组（n=7）
T1:0 min	4.30 ± 0.19	4.98 ± 0.49	4.50 ± 0.49	5.02 ± 0.60	5.34 ± 0.36	5.88 ± 0.43	5.34 ± 0.22	5.68 ± 0.28
T2:15/30 min	16.70 ± 3.56	23.50 ± 2.50^{a}	17.60 ± 1.60^{bc}	23.50 ± 2.65^{a}	3.96 ± 0.33	5.12 ± 0.29^{a}	3.42 ± 0.28^{bc}	4.94 ± 0.50^{a}
T3:30/60 min	13.10 ± 1.56	19.10 ± 2.59^{a}	14.20 ± 1.22^{bc}	18.30 ± 1.56^{a}	3.26 ± 0.47	4.64 ± 0.70^{a}	2.92 ± 0.84^{bc}	4.34 ± 0.49^{a}
T4:60/90 min	8.18 ± 0.89	10.8 ± 1.69^{a}	8.42 ± 1.23^{bc}	11.6 ± 1.39^{a}	2.72 ± 0.47	4.36 ± 0.98^{a}	3.10 ± 0.20^{bc}	3.78 ± 5.63^{a}
T5:120 min	5.60 ± 0.43	5.96 ± 0.24	5.52 ± 0.74	6.06 ± 0.30	4.10 ± 0.26	4.60 ± 0.78	3.94 ± 0.40	4.28 ± 0.24
分组主效应		F=12.836，P=0.000				F=15.411，P=0.000		
时间主效应		F=571.459，P=0.000				F=87.893，P=0.000		
组 × 时间交互效应		F=7.582，P=0.000				F=3.604，P=0.000		

注：a，与正常对照组比较 P < 0.01；b：与 Ob 组比较 P < 0.05；c：与 Ob+Sham 组比较 P < 0.05

0.012），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.534）；两两比较各组 HOMA-IR 指数结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组大鼠 HOMA-IR 值均较正常组明显增加（P=0.000），Ob+RYGB 组 HOMA-IR 值较 Ob 组、Ob+Sham 组明显减少（P=0.000），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.719）。见表 1。

2.5 各组大鼠肝脏糖原染色结果

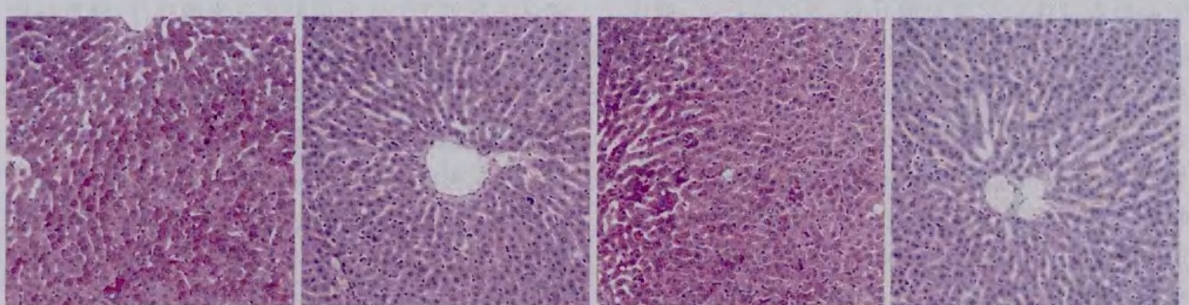
PAS 染色后肝脏糖原在光镜下呈紫红色颗粒。染色结果显示：正常对照组肝糖原含量丰富，染色深。Ob 组和 Ob+Sham 组，肝糖原沉积较正常对照组明显减少，染色浅。Ob+RYGB 组大鼠 RYGB 术后肝脏糖原沉积较 Ob 组和 Ob+Sham 组明显增多，染色较深，接近正常组水平。表 3 显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组肝脏组织 PAS 染色阳性面积百分比分别为（43.26 ± 3.60）%、（24.13 ± 5.31）%、（38.93 ± 4.92）%和（23.13 ± 4.85）%。4 组大鼠肝脏糖原含量差异具有统计学意义（F=42.468，P=0.000）。组间两两比较结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组肝糖原含量均较正常对照组相比明显减少（P=0.000），Ob+RYGB 组肝糖原含量较 Ob 组和Ob+Sham 组明显增加（P=0.000），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.061）。见图 2，表 3。

2.6 Gsk-3β、Gs mRNA 荧光定量 PCR 的检测结果

qRT-PCR 法检测各组 Gsk-3β、Gs mRNA，以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法比较其定量结果，以正常对照组肝脏组织中 Gsk-3β、Gs mRNA 表达水平为对照，表 3 结果显示，正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组肝脏组织中 Gsk-3β 表达量为（1.05 ± 0.33）、（2.03 ± 0.64）、（0.75 ± 0.13）和（1.94 ± 0.50）；Gs 表达量依次为（1.06 ± 0.42）、（0.57 ± 0.15）、（1.33 ± 0.53）和（0.55 ± 0.18）。采用方差分析大 4 组大鼠肝脏组织中 Gsk-3β 及 Gs mRNA 水平，差异具有统计学意义（分别为 F=12.495，P=0.000；F=7.123，P=0.002）。组间两两比较 Gsk-3β mRNA 表达结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组 Gsk-3β 表达量均较正常对照组相比明显增加（P=0.001、P=0.002），Ob+RYGB 组 Gsk-3β 表达量较 Ob组和 Ob+Sham 组明显减少（P=0.000），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.264）；两两比较 Gs mRNA 表达结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组 Gs 表达量均较正常对照组相比明显减少（P=0.027、P=0.020），Ob+RYGB 组 Gs 表达量较 Ob 组和 Ob+Sham 组明显增加（P=0.001），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.197）。见表 3。

2.6 大鼠肝脏 Gsk-3β 和 Gs 蛋白 Western blot 检测结果

Western blot 法检测各组 Gsk-3β、Gs 蛋白表达水平，以 β-actin 为内参，采用 Quantity one 软件分析各条带灰度值。表 3 显示：正常对照组、Ob 组、Ob+RYGB 组和 Ob+Sham 组肝脏组织中 Gsk-3β 蛋白表达量分别为 0.43 ± 0.14、0.68 ± 0.08、0.53 ± 0.09、0.70 ± 0.09；Gs 蛋白表达量依次为 0.54 ± 0.12、0.36 ± 0.06、0.58 ± 0.15、0.33 ± 0.04。采用方差分析 4 组大鼠肝脏组织中 Gsk-3β 及 Gs 蛋白表达水平，差异具有统计学意义（分别为 F=6.308，P=0.008；F=6.207，P=0.009）。组间两两比较 Gsk-3β 蛋白表达结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组Gsk-3β



A. 正常对照组　B. Ob 组　C. Ob+RYGB 组　D. Ob+Sham 组

图 2 各组大鼠肝脏糖原染色结果（PAS 染色，200×）

Fig.2 Hepatic histomorphology of rats in each group（PAS staining，200×）

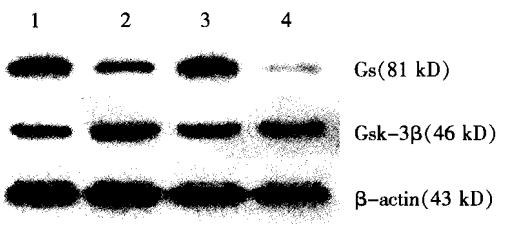
表 3 各组肝脏糖原含量及 Gsk-3β、Gs 的表达情况（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Hepatic glycogen content and expression of Gsk-3β and Gs in each group（$\bar{x} \pm s$）

指标	正常对照组（n=9）	Ob组（n=8）	Ob+RYGB 组（n=7）	Ob+Sham组（n=7）	F值	P值
PAS染色阳性百分比（%）	43.26 ± 3.60	24.13 ± 5.31[a]	38.93 ± 4.92[bc]	23.13 ± 4.85[a]	42.468	0.000
Gsk-3β mRNA 表达	1.05 ± 0.33	2.03 ± 0.64[a]	0.75 ± 0.13[bc]	1.94 ± 0.50[a]	12.495	0.000
Gs mRNA 表达	1.06 ± 0.42	0.57 ± 0.15[a]	1.33 ± 0.53[bc]	0.55 ± 0.18[a]	7.123	0.002
Gsk-3β 蛋白表达	0.43 ± 0.14	0.68 ± 0.08[a]	0.53 ± 0.09[c]	0.70 ± 0.09[a]	6.308	0.008
Gs 蛋白表达	0.54 ± 0.12	0.36 ± 0.06[a]	0.58 ± 0.15[bc]	0.33 ± 0.04[a]	6.207	0.009

注：a，与正常对照组比较 P<0.05；b：与 Ob 组比较 P<0.01；c：与 Ob+Sham 组比较 P<0.05

蛋白表达量较正常对照组明显增加（P=0.004、P=0.003），Ob+RYGB 组 Gsk-3β 蛋白表达量较 Ob+Sham 组明显减少（P=0.038），而 Ob+RYGB 组与正常对照组、Ob 组比较无明显差异（P=0.186、P=0.059）；两两比较 Gs 蛋白表达量，结果显示：Ob 组、Ob+Sham 组 Gs 蛋白表达量均较正常对照组相比明显减少（P=0.027、P=0.013），Ob+RYGB 组 Gs 蛋白表达量较 Ob 组、Ob+Sham 组明显增加（P=0.009、P=0.004），而 Ob+RYGB 组与正常对照组比较无明显差异（P=0.574）。见图 3，表 3。



1：正常对照组；2：Ob 组；3：Ob+Sham 组；4：Ob+RYGB 组

图 3 各组大鼠 Gsk-3β 和 Gs 表达情况

Fig.3 Expression of Gsk-3β and Gs in each group

3 讨 论

肥胖是一组多因素引起的慢性代谢性疾病，常以脂肪细胞数量和体积增加，并在某些局部过度聚集导致体脂占体质量的百分比异常增高为特征[14]。肥胖患者常伴有空腹血糖升高，胰岛素抵抗，糖代谢异常[15]。肥胖症的内科治疗，如生活方式干预以及药物治疗，均较难达到长期稳定的效果。RYGB 作为目前应用广泛的一种代谢手术，通过绕过大部分的胃、十二指肠和近端空肠，从而创建小胃囊，改变食物流出道[12]。在代谢手术的研究中，RYGB 手术对肥胖及糖尿病代谢紊乱的影响一直是研究热点之一。然而，目前 RYGB 手术影响机体糖代谢的研究主要集中于糖尿病的研究以及肥胖患者的临床研究，其结果显示 RYGB 手术可改善肥胖和糖尿病患者代谢紊乱状态，但机制尚不明确[8,10,16]。Abusnana 等[16]研究发现，肥胖患者 RYGB 术后 12 月体质量降低指数为 68%，脂肪量降低 46%，血脂、血糖和糖化血红蛋白均的到显著改善。在本研究中，观察到肥胖大鼠 RYGB手术后，体质量显著降低，空腹血糖及血浆胰岛素水平显著下降，胰岛素抵抗状态明显改善。在 Arapis 等[17]研究中也发现 RYGB 手术后肥胖大鼠糖耐量及胰岛素耐量异常得到明显改善，表明 RYGB 术可显著减轻肥胖大鼠体质量和调节糖代谢平衡。

Gs 是糖原合成过程中的关键酶和限速酶，同时也是胰岛素作用的主要靶酶，其调节异常可导致糖原合成代谢紊乱，糖原沉积下降[18]。Gsk-3β 作为胰岛素信号传导通路中的关键负性调节因子，不仅参与调控糖异生及糖原合成，还能负反馈调节葡萄糖转运、胰岛素分泌及葡萄糖内稳态平衡[5,7,19-20]。在胰岛素介导的 PI3K/AKT 通路的作用下，磷酸化 AKT 可通过抑制 Gsk-3β、增加 Gs 活性发挥促进糖原合成、降低肝糖输出的作用[19-20]。研究表明，糖尿病小鼠肝脏组织中糖原含量降低，Gsk-3β表达增加，Gs 表达下调，活性降低，抑制 Gsk-3β 表达后，Gs 表达上调，活性增加[7,21]。本实验研究发现，与正常对照组比较，肥胖大鼠体质量显著增加，糖耐量及胰岛素耐量明显异常，空腹血糖及血浆胰岛素水平升高，HOMA-IR 指数显著升高，肝脏糖原沉积明显下降，表明随着肥胖发生大鼠出现糖代谢紊乱。同时，Gsk-3β 表达水平明显降低，Gs 表达水平明显增加，表明肥胖大鼠肝脏糖原合成代谢也出现一定程度的紊乱，并与 Gsk-3β/Gs 表达失调密切相关。有研究表明 Gsk-3β 表达失调可能与 Wnt 信号通路的调控有关[22]，但具体机制有待进一步研究。

Paranjape[9]及 Wu[10]等研究表明，RYGB 手术能够显著改善 T2DM 大鼠肝胰岛素敏感性，降低肝糖输出，增加肝脏糖原含量。本研究发现，RYGB 术后肥胖大鼠肝脏糖原沉积较肥胖组和假手术组明显增加，表明 RYGB 术后肥胖大鼠肝脏糖原合成代谢得到一定程度的改善。Gsk-3β 和 Gs 是糖原合成代谢中的关键酶，他们的激活或抑制直接影响到肝脏糖原合成作用[19-20]。进一步检测 Gsk-3β 和 Gs 表达情况发现，经 RYGB 治疗后，Gsk-3β 表达水平较Ob 组及 Ob+Sham 组明显下调，而 Gs 表达水平较Ob 组及 Ob+Sham 组明显上调，提示影响肥胖大鼠肝脏 Gsk-3β 及 Gs 表达可能是 RYGB 手术后增加肝脏糖原合成、改善肝糖代谢紊乱的机制之一，该作用机制可能为临床防治和减缓肥胖及相关糖代谢紊乱的发生、发展提供新靶点。有研究表明 RYGB 手术对糖尿病大鼠血糖的影响可能与 Wnt 信号通路激活，抑制 β 细胞凋亡有关[23]。但 RYGB 术后肥胖大鼠肝脏 Gsk-3β/Gs 的影响是否通过 Wnt 信号通路激活，以及其中具体信号调控机制值得进一步研究阐明。

参 考 文 献

[1] Ng M,Fleming T,Robinson M,et al. Global,regional,and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet,2014,384(9945):766-781.

[2] 李晓燕,姜 勇,胡 楠,等. 2010 年我国成年人超重及肥胖流行特征[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(8):683-686.

[3] World Health Organization.Obesity and Overweight[EB/OL].(2015-01)[2016-04] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/

[4] Huang DW,Chang WC,Wu JS,et al. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet[J]. Nutr Res,2016,36(2):150-160.

[5] Dokken BB,Henriksen EJ. Chronic selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances glucose disposal and muscle insulin action in prediabetic obese Zucker rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2006,291(2):E207-213

[6] Nikoulina SE,Ciaraldi TP,Mudaliar S,et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle[J]. Diabetes,2002,51(7):2190-2198.

[7] Rao R,Hao CM,Redha R,et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition improves insulin-stimulated glucose metabolism but not hypertension in high-fat-fed C57BL/6J mice[J]. Diabetologia,2007,50(2):452-460.

[8] 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,e245.

[9] Paranjape SA,Chan O,Zhu W,et al. Improvement in hepatic insulin sensitivity after Roux-en-Y gastric bypass in a rat model of obesity is partially mediated via hypothalamic insulin action[J]. Diabetologia,2013,56(9):2055-2058.

[10] Wu S,Tang JC,Zou H,et al. Influence of gastric bypass surgery on hepatic gluconeogenesis in type 2 diabetic Goto Kakizaki rats[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery,2012,15(11):1142-1145.

[11] Chandler PC,Viana JB,Oswald KD,et al. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet[J]. Physiol Behav,2005,85(2):221-230.

[12] Bueter M,Abegg K,Seyfried F,et al. Roux-en-Y gastric bypass operation in rats[J]. Journal Vis Exp,2012(64):e3940.

[13] Matthews DR,Hosker JP,Rudenski AS,et al. Homeostasis model assessment:insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man[J]. Diabetologia,1985,28(7):412-419.

[14] 中华医学会内分泌学分会肥胖学组. 中国成人肥胖症防治专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(9):711-717.

[15] 沈 磊,徐大麟,朱小珍,等. 2007 年上海公共卫生国际研讨会论文集:肥胖与糖耐量异常的关系[C]. 上海,2007

[16] Abusnana S,Abdi S,Tagure B,et al. Bariatric surgery outcomes:a single-center study in the United Arab Emirates[J]. Diabetes,Metabolic Syndrome and Obesity,2015(8):461-471.

[17] Arapis K,Cavin JB,Gillard L,et al. Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats[J]. PLoS One,2015,10(30):e0121414.

[18] 桑 敏,李 威,胡 敏,等. 糖原合成酶激酶-3 与糖代谢异常的关系[J]. 中国糖尿病杂志,2011,3(2):174-177.

[19] MacAulay K,Woodgett JR. Targeting glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the treatment of Type 2 diabetes[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets,2008,12(10):1265-1274.

[20] Summers SA,Kao AW,Kohn AD,et al. The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism[J]. J Biol Chem,1999,274(25):17934-17940.

[21] 宋佰慧,程云龙,辛禧瑞,等. 芦根乙醇提取物对糖尿病小鼠肝糖原含量及糖原合成酶的影响[J]. 天津医药,2014,56(1):65-67.

[22] Amit S,Hatzubai A,Birman Y,et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45:a molecular switch for the Wnt pathway[J]. Genes Dev,2002,16(9):1066-1076.

[23] 高向楠,柴 芳,赵树鹏. 胃旁路术对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(15):4416-4418.

（责任编辑：冉明会）