

二甲双胍改善去势大鼠胰岛素抵抗的机制研究

邱士玉, 康白*, 王志新, 张广学, 张秀荣, 李承德(潍坊医学院应用药理学实验室, 山东 潍坊 261053)

摘要:目的 探讨二甲双胍(MF)对去势雌性大鼠胰岛素抵抗的改善作用及机制。方法 采用放射免疫分析法 RIA 测定血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)、胰岛素(INS)的水平, 采用酶联免疫吸附试验 ELISA 测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平, 采用逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 测定胰岛细胞因子信号转导抑制因子-3(suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3)的基因表达。结果 与假手术(SHAM)组比较, 去势(OVX)模型组 E₂、P 的含量显著降低, 而 TNF- α 、INS 含量则明显升高, 同时大鼠胰岛 SOCS-3 基因表达明显上调($P<0.01$)。与 OVX 组比较, 去势二甲双胍低剂量(MF_低)组无显著影响, 去势二甲双胍高剂量(MF_高)组 E₂、P 含量则显著升高($P<0.05$), INS 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 大鼠胰岛 SOCS-3 基因表达明显下调($P<0.01$)。结论 长期大剂量使用 MF 可以改善去势大鼠的胰岛素抵抗现象, 其机制可能与下调 TNF- α 和胰岛 SOCS-3 基因表达有关。

关键词: 二甲双胍; 胰岛素抵抗; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞因子信号转导抑制因子-3

中图分类号: R962.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0243-03

Metformin Mechanism of Insulin Resistance in Ovariectomized Female Rats

QIU Shiyu, KANG Bai*, WANG Zhixin, ZHANG Guangxue, ZHANG Xiurong, LI Chengde(Pharmacology Laboratory of Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the improvement effect and mechanism of metformin(MF) on insulin resistance in castrated female rats. **METHODS** The levels of serum estradiol(E₂), progesterone (P) and insulin (INS) were determined by radioimmunoassay method. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression of pancreas islet suppressor of cytokine signaling-3(SOCS-3) was determined by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. **RESULTS** Compared with NS group, the serum E₂ and P content in OVX group were significantly decreased, the TNF- α , INS content were significantly increased, while the SOCS-3 mRNA expression of pancreas islets were significantly increased($P<0.01$). Compared with the OVX group, MF low group has no significant change. Serum E₂ and P content were significantly increased ($P<0.05$) in MF high group. The TNF- α , INS content significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the SOCS-3 mRNA expression of islets were significantly decreased ($P<0.01$). **CONCLUSION** Long-term with a large dose of MF 270 mg·kg⁻¹·d⁻¹ can improve ovariectomized rats insulin resistance phenomenon. The mechanism may be related with the decreased of TNF- α and SOCS-3 mRNA expression of islets.

KEY WORDS: metformin; insulin resistance; TNF- α ; SOCS-3

MF 属于双胍类口服降糖药, 主要用于 2 型糖尿病的治疗。2 型糖尿病是由于胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌缺陷造成的进展性失调^[1], 胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病的重要特征之一, 同时亦是肥胖症、多囊卵巢综合症等代谢紊乱性疾病的特征, 而 IR 的疾病或状态往往同时伴有性激素代谢异常。IR 是由多种原因引起的, 而胰岛素信号转导受阻或减弱是导致 IR 的主要原因。新近研究发现, SOCS-3 在胰岛素的转运、与受体结合以及信号转导等各个环节发挥了重要作用, 可引起 IR^[2]。另有研究表明, TNF- α 等细胞因子可诱导 SOCS-3 mRNA 表达并抑制胰岛素信号转导, 从而诱导

IR^[3], 经 MF 治疗后 IR 有明显的改善^[4], 而 MF 对更年期大鼠胰岛内分泌功能的作用及改善胰岛素抵抗的机制研究, 国内外尚未见报道。本研究采用 RIA、ELISA、RT-PCR 等方法, 从功能和基因的角度, 系统观察了 MF 对去势大鼠胰岛素抵抗与胰岛 SOCS-3 表达的影响, 为 MF 对临床更年期肥胖型糖尿病等内分泌疾病的治疗提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 盐酸二甲双胍片(蓬莱诺康药业有限公司生产, 批号: 100316)。UNIQ-10 柱式

作者简介: 邱士玉, 女, 硕士生 Tel: (0536)2602250 E-mail: qiushiyu1987@163.com

*通信作者: 康白, 女, 教授, 硕士 Tel: (0536)2602250 E-mail: kb615@163.com

总 RNA 抽提试剂盒、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒均由上海生工生物工程有限公司提供,PCR 扩增试剂盒由大连宝生物提供, TNF- α ELISA 检测试剂盒由上海丽臣生物科技有限公司提供。台式高速冷冻离心机、梯度 PCR 仪: 均由德国 Eppendorf 公司生产; 酶标仪: 由日本 BIO-RAD 公司生产。

1.1.2 动物 健康 Wistar 未孕大鼠 24 只, ♀, 体重为(200±20)g, 由山东鲁抗实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK20080002。

1.2 方法

1.2.1 给药 选取健康未孕 Wistar 大鼠 24 只, ♀, 并按经典大鼠去势法进行去势手术, 另选 8 只健康大鼠为空白对照, 术后适应环境 1 周, 随机分为 4 组, SHAM 组、OVX 组、MF_低组和 MF_高组, 分别灌胃给药 MF 135、270 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 及等容量生理盐水。连续给药 42 d。

1.2.2 取材 于末次给药禁食 12 h 后, 颈总动脉取血约 5 mL, 室温放置 20 min, 离心取血清-20 °C 冷冻保存待测。同时迅速取大鼠胰尾组织放入冻存管, 立即置于液氮保存待测。

1.2.3 MF 对去势大鼠血清 E₂、P、INS、TNF- α 水平的影响 用 RIA 测定各组大鼠血清 E₂、P、INS 的水平。用 ELISA 测定各组大鼠血清 TNF- α 含量。操作步骤均按试剂盒说明书进行。

1.2.4 MF 对去势大鼠胰岛 SOCS-3mRNA 表达的影响 mRNA 提取: 取 30~50 mg 大鼠胰尾组织, 迅速置于液氮中研磨匀浆, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。紫外分光光度计测定其 OD 值 (A260/A280)在 1.8~2.0 之间。逆转录 RT 反应按试剂盒合成第 1 链 cDNA, PCR 扩增反应用 β -actin 做内参进行对比, 25 μ L 体系包括 TaKaRaEx Taq 0.125 μ L、10×Ex Taq Buffer 2.5 μ L、dNTP Mixture

2 μ L、模板 DNA 2 μ L、随机引物 1 μ L、灭菌双蒸水补足 25 μ L, 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 2 min, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 35 个循环, 扩增产物用 2%琼脂糖电泳检测, Quantity one 系统检测 PCR 产物灰度值。 β -actin 为 5'-TTGTAACCAACTGGG ACGATATGG-3', 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGC TAGG-3'。扩增长度为 764 bp。SOCS-3 为 5'-TCA CCCACAGCAAGTTTCC-3', 5'-GGATGCGTAGGT TCTTGGTC-3'。扩增长度为 282 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 验证各实验数据服从近似正态分布, 各组方差齐性后, 采用方差分析进行比较。

2 结果

2.1 MF 对去势大鼠血清 E₂、P、INS、TNF- α 水平的影响

与 SHAM 组比较, OVX 组大鼠血清 E₂ 和 P 的含量均显著降低($P<0.01$), 血清 INS 及 TNF- α 的水平则明显升高($P<0.01$)。MF_低对 OVX 大鼠血清 E₂、P 及 INS 的水平无显著影响($P>0.05$); MF_高则可引起 OVX 大鼠血清 E₂、P 水平显著升高($P<0.05$); 血清 INS 及 TNF- α 的含量明显降低($P<0.01$)。结果见表 1。

2.2 MF 对去势大鼠胰岛 SOCS-3mRNA 表达的影响

琼脂糖凝胶电泳见图 1, 结果表明, 与 SHAM 组比较, OVX 组 PCR 产物浓度明显大于 SHAM 组, 灰度值分析结果显示, OVX 组大鼠胰岛 SOCS-3 表达显著升高($P<0.01$)。

与 OVX 组比较, MF_高组 PCR 产物浓度明显小于 OVX 组, 灰度值分析结果表明, 大鼠胰岛 SOCS-3 表达明显降低($P<0.01$)。结果见表 2。

表 1 MF 对去势大鼠血清 E₂、P、INS 及 TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 1 The influence of MF on serum levels of E₂, P, INS and TNF- α in OVX rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	雌二醇/ng·L ⁻¹	孕酮/ μ g·L ⁻¹	胰岛素/mIU·L ⁻¹	肿瘤坏死因子- α /ng·L ⁻¹
假手术	—	21.08±6.98	10.68±3.15	25.28±3.59	0.0574±0.0103
去势模型	—	9.12±1.87 ¹⁾	5.08±2.63 ¹⁾	38.96±3.81 ¹⁾	0.0767±0.016 ¹⁾
二甲双胍 _低	135	12.46±2.75	7.14±2.87	36.51±2.34	0.0493±0.0232
二甲双胍 _高	270	14.34±4.20 ²⁾	9.17±2.51 ²⁾	29.82±1.86 ³⁾	0.0451±0.0077 ²⁾

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与去势模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with SHAM grope, ¹⁾ $P<0.01$; compared with OVX grope, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

表 2 MF 对去势大鼠胰岛 SOCS-3mRNA 表达的影响
Tab 2 The influence of MF on socs-3 expression of pancreas in OVX rats

组 别	剂量/mg·kg ⁻¹	数量/n	SOCS-3/β-actin
假 手 术	—	8	0.501±0.089
去势模型	—	8	0.875±0.107 ¹⁾
二甲双胍 _低	135	8	0.632±0.133
二甲双胍 _高	270	8	0.543±0.156 ²⁾

注：与假手术组比较，¹⁾P<0.01；与去势模型组比较，²⁾P<0.01
 Note: Compared with SHAM grope, ¹⁾P<0.01; compared with OVX grope, ²⁾P<0.01

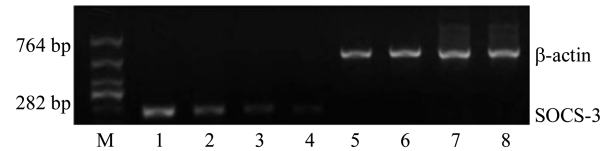


图 1 去势大鼠胰岛 SOCS-3mRNA 表达电泳图
 M-Marker; 1-去势组 SOCS-3; 2-MF_低组 SOCS-3; 3-MF_高组 SOCS-3; 4-对照组 SOCS-3; 5-8-β-actin
Fig 1 SOCS-3 mRNA expression in pancreas of ovariectomized group rats
 M-Marker; 1-OVX SOCS-3; 2-MF_低 SOCS-3; 3-MF_高 SOCS-3; 4-SHAM SOCS-3; 5-8-β-actin

3 讨论

更年期肥胖型糖尿病为临床 2 型糖尿病的常见类型，在其发生发展中往往出现神经、内分泌、免疫网络的功能紊乱。Atamer 等^[5]的实验表明，卵巢功能障碍者，瘦素、胰岛素水平较高，与正常女性比较有显著性差异,同时多伴有胰岛素抵抗现象。本研究发现，去势后大鼠血清 E₂、P 含量明显降低，同时 INS 含量显著升高，出现胰岛素抵抗现象。而长期大剂量应用 MF 可明显增加去势大鼠血清 E₂、P 的含量，同时明显降低血清 INS 水平，改善胰岛素抵抗现象。

胰岛素抵抗是由多种原因引起的，近年来的研究发现胰岛素抵抗的产生与炎症因子水平密切相关，炎症因子的长期过度分泌，可能是导致胰岛β细胞分泌胰岛素功能受损及产生胰岛素抵抗的主要因素^[6]。TNF-α 与 IL-6 作为最具代表性的细胞因子，在炎症和免疫反应中起核心调节作用^[7]。其中 TNF-α 通过直接作用于胰岛素信号转导系统，干扰胰岛素受体信号转导而改变胰岛素的敏感性，直接或间接地影响着体内葡萄糖代谢，引起胰岛素抵抗的现象^[8]。新近的研究发现，胰岛素信号传递受阻或减弱是导致胰岛素抵抗的主要原因之一，SOCS-3 通过与胰岛素受体相互作用抑制

胰岛素信号转导，和其他 SOCS 家族成员一样，SOCS-3 主要参与负调控细胞因子及一些激素诱导的细胞信号转导^[3,9]。此外，许多研究表明，SOCS-3 可抑制促肾上腺皮质激素及促黑素皮质原的表达，胰岛素、瘦素、生长因子、TNF-α、IL-6 等可诱导 SOCS-3 的基因表达，其表达产物又可以阻碍这些细胞因子的信号转导^[3,10]。该实验进行的研究结果显示，去势后大鼠血清 TNF-α 含量明显升高，同时大鼠胰岛 SOCS-3 表达明显增多，长期大剂量使用 MF 后，血清 TNF-α 含量显著降低，同时胰岛 SOCS-3 的基因表达明显减弱，其机制与血清 TNF-α 可诱导胰岛 SOCS-3 表达和产生有关。

综上所述，MF 可以改善去势大鼠的胰岛素抵抗，为临床更年期糖尿病治疗提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] SHENG J M. Latest progress of drugs used in type-2 diabetes mellitus treatment [J]. Chin J Mod App Pharm(中国现代应用药学), 2011, 18(4): 311-314.
- [2] STEPPAN C M, WANG J, WHITEMAN E L, et al. Activation of SOCS-3 by resistint [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(4): 1569-1575.
- [3] EMANUELLI B, PERALDI P, FILLOUX C, et al. SOCS-3 is an insulin induced negative regulator of insulin signaling [J]. Biol Chem, 2000, 275(21): 15985-15991.
- [4] KANG B, HANG H R, LI G Z. Effects of metformin on estrodialol and progesterone in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2003, 19(2): 237-238.
- [5] ATAMER A, DEMIR B, BAYHAN G, et al. Serum levels of leptin and homocysteine in women with polycystic ovary syndrome and its relationship to endocrine, clinical and metabolic parameters [J]. J Int Med Res, 2008, 36(1): 96-105.
- [6] CAREY A L, LAMONT B, RKOPOULOS S, et al. Interleukin-6 gene expression is increased in insulin resistant rat skeletal muscle following insulin stimulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(4): 837-840.
- [7] KERN P A, RANGANATHAN S, LI C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 280(5): 745-751.
- [8] CHENG Y F, WU Z M, PU F X. IL-6, TNF-α and Type 2 diabetes mellitus insulin resistance [J]. Anat Res(解剖学研究), 2010, 32(4): 291-293.
- [9] WANG N H, GUO X H. SOCS-3 and insulin resistance [J]. Foreign Med Sci (Endocrinol)(国外医学 内分泌学分册), 2005, 25(6): 409-411.
- [10] DEY B R, FURLANETTO R W, NISSLEY P. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor- I receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(1): 38-43.

收稿日期：2012-05-15