

阿司匹林增加高脂喂养 Wistar 大鼠胰岛素敏感性和 Mfn2mRNA 的表达

陈小琳¹, 余辉², 黄艳¹, 江柳¹, 孙永林¹ (1.武汉大学人民医院, 武汉 430060; 2.黄石市中心医院, 湖北 黄石 435001)

摘要: 目的 研究阿司匹林对高脂喂养 Wistar 大鼠胰岛素敏感性和线粒体功能的影响。方法 24 只 Wistar 大鼠, ♂, 分为对照组(NC)、高脂组(HF)和阿司匹林组(AF)($n=8$), 喂养 8 周后, 以高胰岛素-正常葡萄糖钳夹测定大鼠胰岛素敏感性, 取空腹血清测定大鼠谷草转氨酶(ALT)、谷丙转氨酶(AST)、高密度脂蛋白(HDL-C)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBS), 空腹胰岛素(FINS)的水平; 将大鼠肝脏组织进行固定、包埋、切片和 HE 染色, 观察肝脏组织学变化; 取肝脏组织, 测定肝糖原含量; 提取肝细胞线粒体并分离线粒体超氧化物歧化酶, 测定线粒体超氧化物歧化酶活性(SOD), 以及提取肝组织总 RNA, 应用 RT-PCR 测定肝脏组织 Mfn2 mRNA 的表达。结果 与 NC 组大鼠比较, HF 组大鼠肝脏指数、TG、FBS、ALT、AST、INS 明显升高($P<0.05$), GIR 和 SOD 显著降低($P<0.05$), 肝脏组织 Mfn2 mRNA 表达显著降低, 肝细胞体积增大, 胞质中有脂滴空泡; AF 组大鼠上述各指标差异无统计学意义, 显微结构无显著变化。结论 阿司匹林可以改善高脂诱导的胰岛素抵抗及抑制脂肪肝的形成, 这一作用可能是部分通过促进肝细胞 Mfn2 表达、改善线粒体功能实现的。

关键词: 阿司匹林; 胰岛素敏感性; 线粒体; 线粒体融合素基因 2

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)08-0928-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.006

Aspirin Improves Insulin Sensitivity and Mfn2mRNA Expression in High-fat Treated Wistar Rats

CHEN Xiaolin¹, YU Hui², HUANG Yan¹, JIANG Liu¹, SUN Yonglin¹ (1. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Huangshi Central Hospital, Huangshi 435001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of aspirin on insulin sensitivity and Mfn2 mRNA expression in rats fed with high-fat diet. **METHODS** Twenty-four male rats were randomly divided into normal control diet group (NC, $n=8$), high-fat diet group (HF, $n=8$) and aspirin group (AF, $n=8$) according to random digits table. After treatment with different diets for 8 weeks, insulin sensitivity was evaluated by measuring the glucose infusion rate (GIR) using a hyperinsulinemic euglycemic clamp. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), triglycerides (TG), fasting blood sugar (FBS) and insulin (FINS) were measured respectively. The liver tissues of three groups were fixed, sliced, stained and observed with light microscope. The liver glycogen was determined. Superoxide dismutase (SOD) in liver mitochondria was extracted and measured. Mfn2 mRNA in hepatic tissue was detected by reverse transcription PCR. **RESULTS** Compared with the NC group, the liver index and the levels of serum TG, FBS, ALT, AST, and insulin in the HF group were statistically increased ($P<0.05$). The GIR, SOD, and expression of Mfn2 mRNA in the HF group were significantly decreased ($P<0.05$). However, there was no difference in above indicators between the NC group and the AF group. Pathological change of liver tissues by HE staining, normal hepatic plates were shown in NC and AF groups. In HF group, the liver cells of rats showed an increase in size, and included the storage of lipid droplets. **CONCLUSION** Aspirin can improve insulin sensitivity and inhibit hepatic steatosis by high-fat induced, may be partly attributable to promote expression of Mfn2 and improve mitochondrial function in liver of rats.

KEY WORDS: aspirin; insulin sensitivity; mitochondria; mitofusin-2 gene

高脂喂养可以导致大鼠产生胰岛素抵抗, 胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发生、发展的重要病理生理机制之一。近来研究发现, 线粒体功能障碍及氧化损伤与炎症有关^[1-2]。有研究者认为组织慢性炎症是胰岛素抵抗发生机制的早期阶段^[3]。Mfn2 基因编码的线粒体融合蛋白是位于线粒体外膜的 GTP 酶, 是促进线粒体融合膜融合的主

要蛋白, 抑制 Mfn2 表达降低线粒体膜电位, 从而降低了三羧酸循环的电子传递链活性, 使细胞的能量代谢紊乱^[4]。前期研究结果显示小鼠肝脏 Mfn2 表达导致小鼠肝糖输出增多、胰岛素敏感性下降和脂肪代谢紊乱^[5]。本研究旨在观察阿司匹林对高脂喂养大鼠胰岛素敏感性影响, 并探讨其作用机制。

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金(2010CDB06207)

作者简介: 陈小琳, 女, 博士, 副教授, 副主任医师

Tel: (027)88041919-82133

E-mail: weed-2@163.com

1 仪器与材料

One Touch 血糖仪(美国强生稳豪);微量注射泵(德国贝朗);静脉留置针(美国 BD);Wistar 大鼠,♂,购于华中科技大学同济医学院动物中心,实验动物合格证号:00004410。戊巴比妥钠(美国 Sigma);肝糖原测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);肝脏组织线粒体提取试剂盒(美国 GENMED SCIENTIFICS INC);线粒体超氧化物歧化酶分离及活性测定试剂盒(碧云天)。AU2700 全自动生化分析仪(日本 OLYMPUS);BX51 光镜(日本 OLYMPUS);Image 凝胶图像分析系统(美国 Perkin Elmer)。

2 方法

2.1 脂肪乳配置

猪油 25 g,胆固醇 10 g,吐温 80 25 mL,丙二醇 20 mL,脱氧胆酸钠 2 g,蒸馏水 30 mL。

2.2 大鼠分组及处理

将 24 只 Wistar 大鼠,♂,随机分为正常对照组(NC 组)、高脂组(HF 组)和阿司匹林组(AF 组),每组 8 只。NC 组大鼠进食普通大鼠饲料加 2 mL 生理盐水灌胃, HF 组大鼠进食普通大鼠饲料加 2 mL 脂肪乳灌胃, AF 组大鼠进食普通大鼠饲料加 2 mL 脂肪乳和 40 mg·kg⁻¹阿司匹林灌胃,动物实验共 8 周。

2.3 高胰岛素-正常葡萄糖钳夹

每组大鼠取 3 只,受试大鼠空腹 12 h,以 1% 异戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉(30 mg·kg⁻¹);麻醉生效后,分离右侧髂静脉,以静脉留置针穿刺,另两端分别接上输注胰岛素或葡萄糖的输液管;分离左侧颈动脉,以静脉留置针穿刺进行颈动脉插管及固定穿刺针,一端用于取血,另一端接输液管(内有 50 U·mL⁻¹的肝素钠溶液)。首先从动脉插管抽取血液 15 μL 左右,以 One Touch 血糖仪测定基础血糖(basic blood glucose, BBG),然后以恒定的速度(10 mU·kg⁻¹·min⁻¹)输注胰岛素。以后,每 5 min 测定血糖 1 次,当血糖低于基础血糖(0.5 mmol·L⁻¹)时,开始输注 20%葡萄糖。调整葡萄糖输注速率(glucose in-fusion rate, GIR)使血糖控制在 BBG ±0.5 mmol·L⁻¹内。60 min 后,当连续 3 次血糖值均在上述范围时,即认为达到了稳定状态。取稳定状态及以后血糖值的均数为稳态血糖浓度(steady state blood glucose, SSBG),相应 GIR 值均数为稳态葡萄糖输注速率。

2.4 肝糖原测定

取新鲜肝脏组织,漂洗后用滤纸吸干,称重,以糖原水解液水解,后加入肝糖原检测液,混匀后沸水中煮沸 5 min,冷却后于 620 nm 处测定 OD 值。以公式计算糖原含量。

糖原含量(mg·g⁻¹肝组织)=测定管 OD 值/标准管 OD 值×标准管含量(0.01 mg)×样本稀释倍数/1.11。

2.5 肝脏组织线粒体提取

采用差速离心法,取新鲜的动物组织 80 mg 左右,在 1.5 mL 离心管内对剪取的组织进行称重。用 PBS 洗涤组织 1 次。把组织放在一个置于冰上的离心管或培养皿中,用剪刀把组织剪切成非常细小的组织碎片。加入 10 倍体积预冷的线粒体分离试剂,在冰浴上进行匀浆,匀浆 10 次左右,以 2 335 r·min⁻¹的速度在 4 ℃离心 5 min。移出上清,以 10 000 r·min⁻¹的速度在 4 ℃离心 10 min,沉淀即为分离得到的线粒体。

2.6 线粒体超氧化物歧化酶分离及活性测定

取新鲜肝组织 200 mg,放入预冷离心管,切碎组织,加入 1 mL 预冷组织裂解液,充分混匀。在冰槽里研磨,移入 1.5 mL 离心管中,以 9 535 r·min⁻¹的速度在 4 ℃离心 15 min。移出上清液,加入 100 μL GENMED 抑制剂,混匀、分装后置于冰上进行后续检测。根据碧云天超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒产品说明书,分别移取相应样品及待测样品到 96 孔板,混匀反应液,放进 37 ℃培养箱孵育 20 min,即刻放进分光光度计检测,波长为 450 nm。根据公式计算样品 SOD 活性。抑制百分率=(A_{空白对照 1}-A_{空白对照 2}-A_{样品})/(A_{空白对照 1}-A_{空白对照 2})×100%;样品中 SOD 酶活力单位/U=抑制百分率/(1-抑制百分率)。

2.7 生化指标的测定

谷草转氨酶(ALT)、谷丙转氨酶(AST)、高密度脂蛋白(HDL-C)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBS),空腹胰岛素(fasting plasma glucose, FINS)的水平以全自动生化分析仪检测。

2.8 大鼠肝脏组织脂肪变性的观察

取新鲜肝组织进行固定、包埋、切片和 HE 染色,光镜下观察。

2.9 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

利用 Trizol 一步法提取肝脏总 RNA,采用紫外分光计测定 RNA 浓度。取 1 μg 总 RNA 进行 RT-

PCR 获得 cDNA 模板。采用得 Mfn2 引物: 5'-GC TGGGACAGTGATGGTCTT-3'(上游), 5'-CAGAT ACAGGCTCTCCCTGG-3'(下游), 扩增片段 263 bp; β -actin 引物: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'(上游), 5'-TCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'(下游), 扩增片段 389 bp。反应参数为 94 °C 5 min, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Image 凝胶图像分析系统进行半定量分析。

2.10 统计方法

采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据, 结果以

$\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阿司匹林对高脂喂养大鼠体质量、肝脏指数及生化指标的影响

实验前, 3 组大鼠之间体质量、FBS 差异无统计学意义。实验 8 周后, 与 NC 组比较, HF 组体质量、HDL-C 差异无统计学意义; 肝脏指数、TG、FBS、ALT、AST、INS 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); NC 组和 AF 组间差异无统计学意义。结果见表 1。

表 1 大鼠体质量、肝脏指数、TG、肝功能、空腹血糖及胰岛素水平的结果

Tab. 1 Results of body weight, liver index, TG, liver function, fasting blood glucose and insulin levels

组别	体质量/g		肝脏指数	HDL-C	TG	lnALT	lnAST	FBS		INS
	实验前	实验后						实验前	实验后	
NC 组	239.00±6.74	354.50±27.31	0.026±0.002	1.09±0.26	0.56±0.11	3.89±0.54	5.01±0.40	3.85±0.39	3.55±0.12	46.2±1.8
HF 组	240.00±14.83	318.29±49.51	0.032±0.005 ¹⁾	0.93±0.20	0.81±0.28 ¹⁾	4.38±0.40 ¹⁾	5.25±0.52 ¹⁾	3.58±0.46	4.61±0.69 ¹⁾	54.3±1.3 ¹⁾
AF 组	226.00±5.15	310.00±6.58	0.026±0.001	1.07±0.58	0.64±0.23	4.05±0.71	4.73±0.59	3.98±0.42	3.23±0.34	47.4±1.5

注: 与 NC 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with NC group, ¹⁾ $P < 0.05$.

3.2 阿司匹林对高脂喂养大鼠 GIR、肝细胞中肝糖原含量和 GOD 活性的影响

3 组大鼠间葡萄糖输注速率差异有统计学意义, 结果见表 2。与 NC 组比较, HF 组 GIR 和 SOD 显著降低 ($P < 0.05$); AF 组与 NC 组比较, GIR 升高, 但差异无统计学意义。3 组大鼠间肝糖原含量差异无统计学意义。

表 2 大鼠 GIR、肝糖原含量及 SOD 的结果

Tab. 2 Results of GIR, liver mitochondria and SOD in rats

组别	GIR/mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	肝糖原	SOD
NC 组	8.40±0.50	1.73±0.01	13.71±2.67
HF 组	7.29±0.40 ¹⁾	1.82±0.31	9.08±3.12 ¹⁾
AF 组	9.73±1.32	1.97±0.94	14.38±3.41

注: 与 NC 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with NC group, ¹⁾ $P < 0.05$.

3.3 阿司匹林对高脂喂养大鼠肝脏组织 Mfn2 mRNA 表达的影响

3 组大鼠间肝脏组织 Mfn2 mRNA 的表达差异有统计学意义。与 NC 组比较, HF 组 Mfn2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); AF 组与 NC 组间差异无统计学意义。结果见图 1。

3.4 阿司匹林对高脂喂养大鼠肝脏组织学的影响

肝组织染色后光镜下观察显示, NC 组大鼠肝组织细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 排列

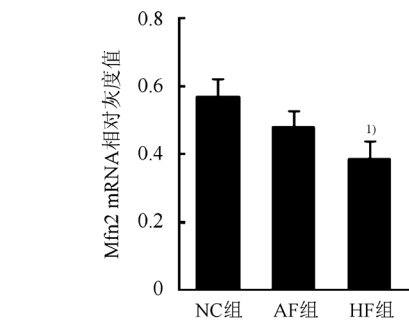
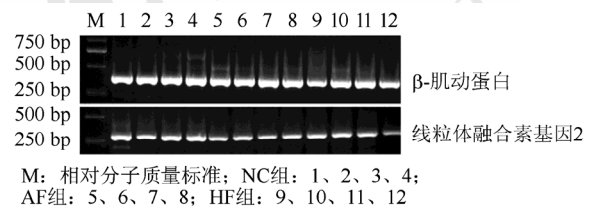


图 1 大鼠肝脏组织 Mfn2 mRNA 的表达与 NC 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Expression of Mfn2 mRNA in liver tissue Compared with NC group, ¹⁾ $P < 0.05$.

整齐, 细胞质红染, 细胞核位于细胞中央; HF 组大鼠肝组织细胞体积增大, 胞质中有脂滴空泡; AF 组大鼠肝组织细胞形态无明显变化。结果见图 2。

4 讨论

越来越多的研究证实 2 型糖尿病是一种慢性炎症性疾病。2 型糖尿病患者处于一种慢性低度亚临床炎症状态。前期研究显示非糖尿病肥胖的 2 型

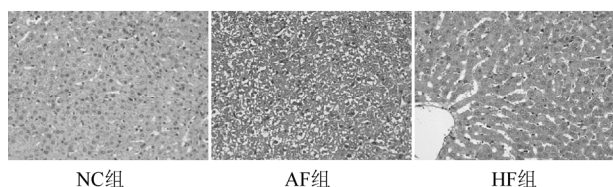


图2 肝脏组织 HE 染色光镜图(200×)

Fig. 2 Optical micrograph HE staining of liver tissue(200×)

糖尿病患者一级亲属已存在早相胰岛素分泌受损, 及高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和白细胞介素 6 (IL-6)水平升高^[6]。阿司匹林为非甾体类抗炎药, 具有抗炎、解热镇痛作用, 目前国内外有多项研究发现阿司匹林可以通过降低炎症因子的表达 (TNF- α 、hs-CRP、IL-6)、抑制胰岛素受体底物蛋白丝氨酸磷酸化、抑制核因子 κ B(NF- κ B)抑制因子激酶(IKK- β)的活性, 从分子水平来增加组织胰岛素敏感性^[7-10]。

本实验以阿司匹林和高脂饮食同时喂养 Wistar 大鼠 8 周, 结果显示, 阿司匹林能有效地改善大鼠胰岛素敏感性、降低高脂喂养大鼠血清 TG、FBS、ALT、AST、INS 水平及肝脏指数, 同时逆转高脂饮食导致的大鼠肝脏脂肪变性。进一步研究显示, 阿司匹林使高脂喂养大鼠肝脏组织 SOD、Mfn2 mRNA 表达上升。SOD 是体内超氧自由基清除因子, 超氧自由基主要产生在线粒体内膜呼吸链。高脂喂养导致肝脏组织 SOD 表达下降, 提示大鼠体内超氧自由基产生过多, 亦即细胞线粒体膜功能受损, 同时本研究也发现高脂喂养大鼠肝脏组织 Mfn2 mRNA 表达下降。因此可以推测阿司匹林提高大鼠肝脏细胞 Mfn2 mRNA 表达, 恢复细胞线粒体结构和功能, 降低了超氧自由基的产生, 从而减少了 SOD 的消耗; 随着细胞线粒体结构和功能的恢复, 大鼠的血糖、血脂、胰岛素敏感性得到明显改善。本研究未发现 3 组大鼠肝脏组织肝糖原含量存在差异, 以高胰岛素-正常葡萄糖钳夹评估胰岛素敏感性发现, HF 组较 NC 组 GIR 显著降低, AF 组与 NC 组比较, GIR 差异无统计学意义, AF 组较 HF 组 GIR 显著性升高。高胰岛素-正常葡萄糖钳夹是评价机体胰岛素对葡萄糖作用的“金标准”, 是通过输入较高的外源性胰岛素水平抑制内源性肝葡萄糖及胰岛素的生成, 以稳态葡萄糖输注速率来评价外周组织(主要是肌肉组织)胰岛素作用, 反映机体组织的胰岛素敏感性; 而肝糖原含量是反映肝脏对胰岛素的敏感性,

肝脏胰岛素抵抗的特征性表现是胰岛素抑制内源性葡萄糖生成能力减弱和肝糖原合成减少。HF 组大鼠空腹血糖高于 NC 组, 提示该组大鼠存在肝胰岛素抵抗, 而肝糖原亦较 NC 组有增高的趋势, 分析原因可能与机体代偿机制及高脂喂养干预时间较短有关。

综上所述, 阿司匹林处理可以改善高脂喂养大鼠的血糖、胰岛素敏感性、血脂及脂肪肝形成, 其机制除了与降低炎症因子的表达有关, 还可通过增加细胞线粒体 Mfn2 表达而改善线粒体功能, 减少超氧自由基的形成从而降低氧化应激损伤达到的。

REFERENCES

- [1] ROSSIGNOL D A, FRYE R E. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism [J]. *Front Physiol*, 2014(5): 150. Doi: 10.3389/fphys.2014.00150. eCollection 2014.
- [2] SAFDAR A, KACZOR J J, HAMADEH M J, et al. Mitochondria dysfunction is associated with increased oxidative stress and inflammation, and Nrf2-mediated antioxidant dysregulation with frail aging [J]. *FASEB J*, 2007(21): 767.1.
- [3] WU Y, WU T, WU J, et al. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet [J]. *J Endocrinol*, 2013, 219(3): 195-204.
- [4] RUIZ L M, JENSEN E L, BUSTOS R I, et al. Adaptive responses of mitochondria to mild copper deprivation involve changes in morphology, OXPHOS remodeling and bioenergetics [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(5): 607-619.
- [5] CHEN X L, XU Y C. Liver-specific reduction of Mfn2 protein by RNAi results in impaired glycometabolism and lipid homeostasis in BALB/c mice [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol(Med Sci)*, 2009, 9(6): 340-343.
- [6] CHEN X L, SUN Y L, WANG Y. Inflammation, insulin action and secretion, dyslipidemia, and dysarteriotony in nondiabetic-obese first-degree relatives of type 2 diabetic subjects [J]. *Obesity and Metabolism*, 2011, 7(1): e1-e5.
- [7] RAGHAVAN R P, LAIGHT D W, CUMMINGS M H. Aspirin in type 2 diabetes, a randomised controlled study: effect of different doses on inflammation, oxidative stress, insulin resistance and endothelial function [J]. *Int J Clin Pract*, 2014, 68(2): 271-277.
- [8] GAO X R, ADHIKARI C M, PENG L Y, et al. Efficacy of different doses of aspirin in decreasing blood levels of inflammatory markers in patients with cardiovascular metabolic syndrome [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(11): 1505-1510.
- [9] FARNEY J K, MAMEDOVA L K, COETZEE J F, et al. Anti-inflammatory salicylate treatment alters the metabolic adaptations to lactation in dairy cattle [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305(2): R110-R117.
- [10] CARVALHO-FILHO M A, ROPELLE E R, PAULI R J, et al. Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IR β /IRS-1 and Akt [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(11): 2425-2434.

收稿日期: 2014-12-23