

槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠肝脏胰岛素抵抗的作用^{*}

凌宏艳^{1,2Δ}, 姚起鑫¹, 齐竹青¹, 杨丝丝¹, 何剑琴¹, 张恺芳¹, 胡弼¹

(1. 南华大学生理学教研室, 2. 南华大学基础医学博士后流动站, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的: 探讨槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠肝脏胰岛素抵抗的影响及其机制。方法: 采用高果糖饲料饲养 Wistar 大鼠 12 周制备 2 型糖尿病大鼠模型, 实验动物随机分为 5 组 ($n=8$): 对照组、模型组、模型 + 不同浓度的槟榔碱 (0, 0.5, 1, 5 mg/kg) 组。4 周后通过检测血糖、血脂、胰岛素、RT-PCR 检测肝脏组成型雄甾烷受体 (CAR)、孕甾烷 X 受体 (PXR)、糖代谢相关基因: 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 和炎症相关因子: 白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 表达, Western blot 检测大鼠肝内 p-AKT 和葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 蛋白表达。结果: 1.5 mg/kg 槟榔碱显著降低糖尿病大鼠体重、空腹血糖、空腹胰岛素、血脂和糖代谢相关基因及炎症相关因子 mRNA 水平, 提高 CAR、PXR mRNA 水平及 p-AKT、GLUT4 蛋白水平。结论: 槟榔碱可能通过提高 CAR 和 PXR 的表达, 导致肝脏糖代谢关键酶 PEPCK、G6Pase 基因表达或者炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 表达降低, 改善 2 型糖尿病大鼠肝脏胰岛素抵抗。

【关键词】 槟榔碱; 2 型糖尿病; 肝脏胰岛素抵抗; 大鼠

【中图分类号】 R332; R997.15

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2014)03-208-05

【DOI】 10.13459/j.cnki.cjap.2014.03.005

The role of arecoline on hepatic insulin resistance in type 2 diabetes rats

LING Hong-yan^{1,2Δ}, YAO Qi-xin¹, QI Zhu-qing¹, YANG Si-si¹, HE Jian-qin¹, ZHANG Kai-fang¹, HU Bi¹

(1. Department of Physiology, 2. Center for Basic Medical Post-doctoral Studies, University of South China, Hengyang 421001, China)

【ABSTRACT】 Objective: To explore the effects of arecoline on hepatic insulin resistance in type 2 diabetes rats and to elucidate its possible mechanism. **Methods:** Forty five Wistar rats were fed with high fructose diet for 12 weeks to induce type 2 diabetic rat model. rats were randomly divided into 5 groups ($n=8$): control group, model group and model group were treated with different dose (0, 0.5, 1, 5 mg/kg) of arecoline. After 4 weeks, the fasting blood glucose, blood lipid and insulin level measured, mRNA expression of liver constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR), glucose-6-phosphatase (G6Pase), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the protein expression of p-AKT and glucose transporter4 (GLUT4) were detected by Western blot. **Results:** 1.5 mg/kg arecoline could significantly decrease the level of fasting blood glucose, blood lipid, blood insulin level and liver G6Pase, PEPCK, IL-6, TNF- α mRNA level in type 2 diabetes rats. 1.5 mg/kg arecoline also could significantly increase CAR, PXR mRNA level and p-AKT and GLUT4 protein expression. **Conclusion:** Arecoline improved hepatic insulin resistance in type 2 diabetes rats by increasing the mRNA levels of CAR and PXR leading to the decreased glucose metabolism and inflammation related genes expression.

【KEY WORDS】 arecoline; type 2 diabetes; hepatic insulin resistance; rats

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是严重危害人类健康的常见病, 目前其发病机理尚不十分明确。以肝糖输出过多为主要表现的肝脏胰岛素抵抗, 是 T2DM 发生发展的关键环节之一。槟榔碱是从天然植物槟榔中提取的生物碱, 研究发现槟榔碱体外给药能抑制口腔角质细胞内白介素和肿瘤坏死因子的表达, 下调氧化低密度脂蛋白和高糖所致血管内皮细胞或巨噬细胞中炎症因子的表达, 具

有抗动脉粥样硬化的作用^[1-3]。我们前期的研究发现槟榔碱能改善 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢紊乱, 然而其机制仍不清楚^[4]。

组成型雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 与孕甾烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 被称为“外源物感受器”, 二者主要在肝中表达, 在外源性物质及类固醇类化合物的代谢与清除过程中起着重要作用。随着研究深入, 发现 CAR、PXR 在调节糖、脂代谢和炎症中发挥重要作用, 或许成为肥胖和 T2DM 治疗的靶标^[5-8]。因此, 我们推测槟榔碱在整体动物模型上可能通过激活 CAR 或 PXR, 降低肝脏糖代谢相关酶和炎症因子表达, 改善

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金 (81000328); 湖南省科技厅项目 (2012RS4012)

【收稿日期】 2013-12-30 **【修回日期】** 2014-02-20

^Δ **【通讯作者】** Tel: 0743-8281389; E-mail: linghongyan@126.com

肝脏胰岛素抵抗。

1 材料与方法

1.1 材料

棕榈碱购自 Sigma 公司; D-果糖购自上海生工生物技术有限公司; 猪油为市售; 胰岛素检测试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司; 即用型 PCR 扩增试剂盒购自 Fermentas 公司; 引物由上海生工生物技术有限公司合成; 蛋白检测试剂盒来自上海碧云天生物公司; 抗 AKT、p-Akt 和 GLUT4 抗体购于细胞信号公司。

1.2 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠模型的复制及实验分组

清洁级雄性 Wistar 大鼠 45 只, 体重 (200 ± 20) g, 由本校实验动物学部提供。大鼠分笼饲养 (每笼 4 只), 置于温度 (22 ± 2) °C, 光照 12/24 h, 自由饮水, 适应性喂养一周。取 8 只作正常对照组: 普通饲料喂养, 另 37 只采用高果糖高脂饲料^[9] (按热卡计算: 果糖占 75%, 脂肪占 12%, 蛋白质占 13%) 喂养。第 12 周末大鼠禁食 12 h 后, 称重, 尾静脉采血, HITACH 自动生化分析仪检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 同位素法测定空腹血胰岛素水平 (fasting insulin, FSI), 当空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 为造模成功^[10]。剔除建模失败的 5 只大鼠, 将建模成功的 32 只大鼠继续以高果糖高脂饲料喂养, 随机分为 T2DM 组、T2DM + 不同浓度的棕榈碱 (0.5, 1.5 mg/kg) 处理组 (T2DM + Are 8 只/组): 以腹腔注射的方式按照分组每天给予不同剂量的棕榈碱处理, 连续 4 周。正常对照组继续以普通饲料喂养。

1.3 样本处理

第 16 周末, 各组大鼠禁食 12 h 后称重, 并按体重给予戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 股动脉取血分离血清, 用于血生化指标检测。另取部分肝组织迅速冷冻于 -80°C 冰箱, 用于 RT-PCR 及 Western blot 检测。

1.4 血生化指标检测

空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 甘油三酯 (triglyceride, TG), 总胆固醇 (total cholesterol, TC), 高密度脂蛋白 (highdensity lipoprotein cholesterol, HDL), 低密度脂蛋白 (lowdensity lipoprotein cholesterol, LDL) 由南华大学第一附属医院检验科 HITACH717 全自动生化分析仪测定。空腹血清胰岛素 (fasting insulin, FSI) 水平按照试剂盒要求检测。

1.5 RT-PCR 检测

肝脏总 RNA 抽取采用 TRizol 一步法, 按试剂

盒要求操作, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列如下: CAR (447 bp): 5'-TACCTGTTTCAGCCATCACC-3', 5'-ACCGCATCTTC-CATCT-TGT-3'; PXR (357 bp): 5'-ATG TCT GAT GCC GCT GTG GA-3', 5'-GCT CTT GGA GGG AGG TTG GT-3'; G6Pase (157 bp): 5'-TCC TGG ACA CTG ACT ATT ACA-3', 5'-CCA CGA AAG ATA GCG AGA-3'; PEPCK (218 bp): 5'-CGC TGG ATG TCA-GAAGAGG-3', 5'-GCAGTGAGTTCCCACCGTAT-3'; TNF-α (371 bp): 5'-ACA ACC AAC TGG TGG TAC CA -3', 5'-AAG TAC TTG GGC AGG TTG AC-3'; IL-6 (512 bp): 5'-CCA CCA TGC CAT GGA GAA G-3', 5'-ATA TTT GGT CTG AGC ATG GTC AAG -3'; GAPDH (308 bp): 5'-TCA ACG GCA CAG TCA AGG-3', 5'-GGC TAA GCA GTT GGT GGT-3'; GAPDH (568 bp): 5'-AAG CCC ATC ACC ATC TTC CA-3', 5'-CCT GCC TCA CCA CCT TCT TG-3'。反应条件如下: 94°C, 5 min; 94°C, 40 s; 59°C, 30 s; 72°C, 30 s (32 cycles), 72°C, 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以 GAPDH 为内参, 定量分析各基因的相对表达量。

1.6 Western blot 检测大鼠肝内 AKT, p-AKT 蛋白及 GLUT4 蛋白的表达

提取肝脏蛋白质, BCA 微量蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度, 取蛋白样品 30 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜、封闭、加入抗 AKT、p-AKT 蛋白或 GLUT4 抗体孵育, 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育, 充分洗涤后与 ECL 化学发光试剂反应, 曝光后扫描, 用图像分析软件进行光密度分析。

1.7 统计分析

所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间比较进行 One-way ANOVA 检验。

2 结果

2.1 棕榈碱对 2 型糖尿病大鼠体重、血糖、血脂和血胰岛素的影响

与正常组大鼠相比, T2DM 组大鼠体重、FBG、FSI、TG、TC 和 LDL 水平显著性上升, 而高密度脂蛋白 (HDL) 水平显著性降低; 1.5 mg/kg 棕榈碱处理组能显著逆转上述改变 ($P < 0.05$)。而 0.5 mg/kg 棕榈碱处理组对上述指标无显著影响 (表 1), 因此在后续的实验中剔除该组。

Tab. 1 Effects of arecoline on body weight, fasting blood glucose, blood lipid and insulin levels in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

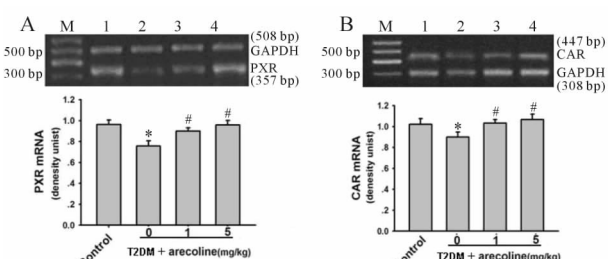
Group	BW (g)	FBG (mmol/L)	FSI (mIU · L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)
Control	385.00 ± 52.26	5.88 ± 1.11	14.46 ± 2.65	0.28 ± 0.05	1.49 ± 0.14	0.19 ± 0.11	1.47 ± 0.28
T2DM	454.00 ± 36.43*	8.92 ± 2.50*	21.49 ± 2.41**	0.65 ± 0.13*	1.93 ± 0.26*	0.31 ± 0.09*	1.26 ± 0.11*
T2DM + ARE 0.5 mg/kg	425.45 ± 39.76	8.05 ± 1.93	20.36 ± 3.02	0.58 ± 0.16	1.89 ± 0.30	0.25 ± 0.08	1.29 ± 0.17
T2DM + ARE 1 mg/kg	390.25 ± 47.98#	6.34 ± 1.37#	16.23 ± 4.25#	0.38 ± 0.25#	1.47 ± 0.29#	0.17 ± 0.12#	1.40 ± 0.29#
T2DM + ARE 5 mg/kg	368.25 ± 42.28#	5.83 ± 0.55#	13.86 ± 0.79#	0.31 ± 0.13#	1.76 ± 0.13#	0.16 ± 0.05#	1.56 ± 0.11#

T2DM: Type 2 diabetes mellitus; ARE: Arecoline; BW: Body weight; FBG: Fasting blood glucose; FSI: Fasting insulin; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; HDL: High density lipoprotein cholesterol; LDL: Low density lipoprotein cholesterol

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs T2DM group

2.2 槟榔碱对2型糖尿病大鼠肝脏PXR和CAR mRNA的影响

与正常对照组相比, T2DM组大鼠肝PXR、CAR表达降低。1, 5 mg/kg 槟榔碱处理后, PXR、CAR mRNA表达显著增加(图1)。

**Fig. 1** Effects of arecoline on mRNA level of PXR and CAR in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

M: Marker; 1: Control group; 2: T2DM group; 3: T2DM + ARE 1 mg/kg group; 4: T2DM + ARE 5 mg/kg group; PXR: Pregnane X receptor; CAR: Constitutive androstane receptor; GAPDH is considered as internal control; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; ARE: Arecoline

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs T2DM group

2.3 槟榔碱对2型糖尿病大鼠肝脏G6Pase, PEP-CK和炎症因子表达的影响

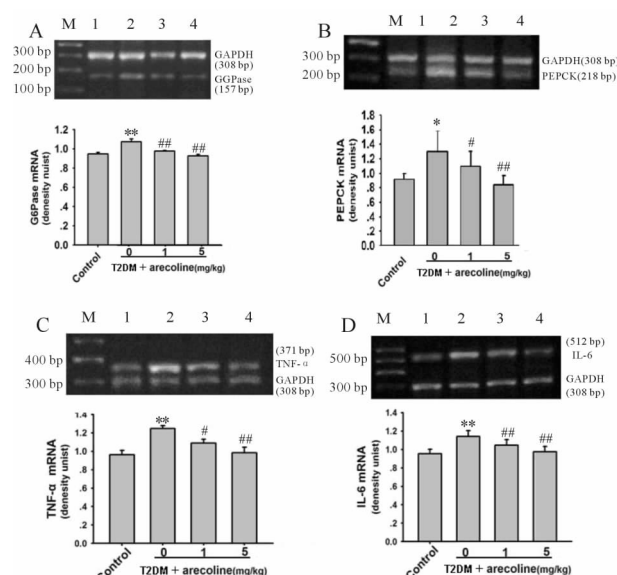
与正常对照组相比, T2DM组大鼠肝脏G6Pase、PEPCK、TNF- α 和IL-6 mRNA表达增加, 1, 5 mg/kg 槟榔碱能显著降低这些基因的表达(图2)。

2.4 槟榔碱对2型糖尿病大鼠肝脏AKT, p-AKT蛋白及GLUT4蛋白表达的影响

与正常对照组相比, T2DM组大鼠肝p-AKT蛋白及GLUT4蛋白表达降低。1, 5 mg/kg 槟榔碱可提高p-AKT蛋白及GLUT4蛋白表达(图3)。

3 讨论

肝脏是机体能量代谢的主要器官,也是胰岛素作用的重要靶器官。肝脏胰岛素抵抗主要指胰岛素抑制肝糖输出能力减弱,是糖尿病等代谢综合征发病的主要环节,因此改善肝脏胰岛素抵抗可能是治

**Fig. 2** Effects of arecoline on mRNA level of G6Pase, PEP-CK, TNF- α and IL-6 in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

M: Marker; 1: Control group; 2: T2DM group; 3: T2DM + ARE 1 mg/kg group; 4: T2DM + ARE 5 mg/kg group; G6Pase: Glucose-6-phosphatase; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs T2DM group

疗T2DM的环节之一。

肝糖输出包括糖异生和糖原分解两部分,其中糖异生占重要地位^[11]。这两个过程均可被胰岛素抑制。当胰岛素抵抗时,二个过程均增加;糖异生增加引起的内源性葡萄糖生成增多,是糖尿病患者空腹血糖升高的主要原因。葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)是调节糖代谢的两个关键酶,其中以G6Pase尤为重要,它催化了肝糖原分解和糖异生的最后一步反应,在肝脏两条产糖途径都起作用;PEPCK则催化糖异生的第1步反应^[12]。越来越多的实验证明糖异生的过度活化与其关键酶PEPCK和G6Pase过表达有关,并且二者的表达主要在转录水平受到调控。本实验中高果糖高脂饲料诱导的2型糖尿病大鼠模型中PEPCK和

G6Pase 显著高表达, 槟榔碱可抑制这两个基因的表达, 提示: 槟榔碱可通过抑制 PEPCK 和 G6Pase 的表达、减少糖异生, 改善肝胰岛素抵抗。

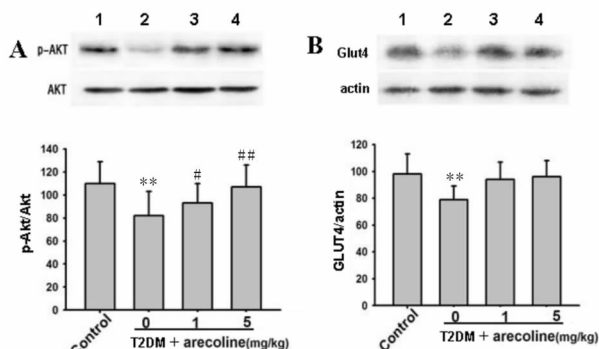


Fig. 3 Effects of arecoline on protein level of phosphorylated-AKT and GLUT4 in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

1: Control group; 2: T2DM group; 3: T2DM + ARE 1 mg/kg group; 4: T2DM + ARE 5 mg/kg ARE group; GLUT4: Glucose transporter 4; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; ARE: Arecoline

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs T2DM group

槟榔碱作为一种外源性化合物进入体内, 需要肝脏“外源性化合物感受器”PXR、CAR 负责对其代谢、解毒。近年来研究发现 CAR、PXR 与控制糖脂代谢及炎症表达的转录因子间存在交叉对话, 对机体营养物质代谢尤其是肝脏的物质代谢和炎症具有重要意义^[5-8]。如: CAR 或 PXR 能直接与 FoxO1 结合, 阻止后者结合到糖异生基因 PEPCK 和 G6Pase, 起到降糖作用; PXR、CAR 还能通过 NF- κ B 途径抑制 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子的表达^[13], 而炎症因子具有明显诱导胰岛素抵抗作用^[14]。为此, 在本实验的预实验中, 根据相关文献分别设置了低剂量 (0.5, 1, 5 mg/kg)、中剂量 (10 mg/kg, 20 mg/kg)、高剂量 (50 mg/kg) 槟榔碱处理 T2DM 大鼠。结果发现中高剂量 (10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg) 槟榔碱腹腔注射, 大鼠数天后出现流涎、犬坐、竖毛、战栗等毒性反应, 且出现时间与严重程度随剂量增大而加重; 而 1 mg/kg 和 5 mg/kg 槟榔碱处理 T2DM 大鼠, 无毒副作用, 且能显著降低血糖, 因此, 在随后的机制探讨中, 我们只选用 1 mg/kg 和 5 mg/kg 槟榔碱处理大鼠, 观察槟榔碱对大鼠肝 PXR、CAR、炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达的影响。结果显示: 1, 5 mg/kg 槟榔碱能显著提高 T2DM 大鼠肝脏 PXR 和 CAR 表达, 降低 TNF- α 、IL-6 的表达, 而槟榔碱对正常大鼠上述各项指标无显著影响 (结果未显示)。

研究显示: 胰岛素诱导的 GLUT4 转位异常是 IR 的重要特征, 其中 Akt 在促进 GLUT4 的转位中起着重要作用^[15]。因此本实验检测了槟榔碱对大鼠肝

脏胰岛素信号通路中 p-AKT 和 GLUT4 表达的影响。结果显示: 1, 5 mg/kg 槟榔碱能显著提高 T2DM 大鼠肝脏 p-AKT 和 GLUT4 蛋白表达水平。提示: 槟榔碱可能通过促进大鼠肝脏 GLUT4 的转位改善 T2DM 大鼠肝脏 IR。

综上所述: 槟榔碱一方面可能通过 PXR、CAR 影响糖代谢相关基因的表达; 另一方面可能通过 PXR、CAR 抑制 T2DM 大鼠肝脏炎症因子的表达, 最终促进大鼠 GLUT4 的转位来改善 T2DM 大鼠肝脏 IR; 然而槟榔碱对脂质影响的具体机制有待进一步实验。

【参考文献】

- [1] 张伟, 周寿红, 凌宏艳, 等. 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(4): 269-272.
- [2] 石翠格, 胡刚, 汪海. 天然药物槟榔碱对氧化低密度脂蛋白致血管内皮细胞损伤的保护作用研究[J]. 科学技术与工程, 2007, 7(12): 24-28.
- [3] 段智变, 汪海. 高糖致内皮细胞粘附分子基因的过度表达以及槟榔碱的调节作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(1): 27-32.
- [4] 姚起鑫, 元竹青, 王光, 等. 槟榔碱改善 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢紊乱[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(11): 1477-1481.
- [5] Gao J, He J, Zhai YG, et al. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(38): 25984-25992.
- [6] Jiang M, Xie W. Role of the constitutive androstane receptor in obesity and type 2 diabetes: a case study of the endobiotic function of a xenobiotic receptor [J]. *Drug Metab Rev*, 2013, 45(1): 156-163.
- [7] Spruiell K, Richardson RM, Cullen JM, et al. Role of pregnane X receptor in obesity and glucose homeostasis in male mice [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(6): 3244-3261.
- [8] Kittayarakul S, Zhao W, Xu M, et al. Identification of three novel natural product compounds that activate PXR and CAR and inhibit inflammation [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(9): 2199-2208.
- [9] Reaven GM, Hwang IS, H OH. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats [J]. *Hypertension*, 1987, 10(5): 512-516.
- [10] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5): 290-294.
- [11] 赵惠中, 萧建中, 杨文英, 等. 肝脏胰岛素抵抗与肝糖输出调控基因表达的关系[J]. 中华肝脏病杂志,

- 2006, 14(1): 45-48.
- [12] Goto M, Yoshioka T, Battelino T, et al. TNF α decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10-day-old rats [J]. *Pediatr Res*, 2001, 49(4): 552-557.
- [13] Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, et al. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- κ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2280-2289.
- [14] 张利华, 张薇, 韦广洪, 等. α -亚麻酸对糖尿病大鼠炎症介质和氧化应激的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(1): 64-67.
- [15] Van DE, Govers R, James DE. Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(4): 1067-1077.

胰岛素诱导的低血糖大鼠下丘脑增食欲素-A 的表达*

赵琳^{1,△}, 贾鲲鹏², 王璐¹, 陈美霓¹, 王亚萍¹, 杨彦玲¹

(1. 延安大学医学院, 2. 延安大学附属医院, 陕西 延安 716000)

【摘要】 目的: 探讨急性低血糖应对大鼠下丘脑增食欲素-A(orexin-A)的表达影响。方法: 胰岛素皮下注射建立急性低血糖大鼠模型, 检测外周血中葡萄糖和胰岛素水平的变化。采用免疫组织化学染色观察下丘脑 orexin-A 表达的改变和灰度值测量, 观察其染色强度。结果: 低血糖禁食组大鼠下丘脑 orexin-A 的表达明显增加 ($P < 0.05$), 而低血糖进食组 orexin-A 表达无明显改变。灰度分析显示低血糖禁食组染色强度最高, 与对照组比较有明显统计学差异 ($P < 0.05$)。结论: 急性血糖的降低可以增强大鼠下丘脑 orexin-A 的表达, 而摄食行为可抑制此效应。

【关键词】 增食欲素-A; 下丘脑; 低糖血症; 胰岛素; 禁食

【KEY WORDS】 orexin-A; hypothalamus; hypoglycemia; insulin; fasting

【中图分类号】 R322.81

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2014)03-212-03

【DOI】 10.13459/j.cnki.cjap.2014.03.006

增食欲素-A(orexin-A)是下丘脑合成和分泌的具有神经兴奋作用的神经肽, 参与摄食、能量代谢、应激等生理活动的调节。Orexin-A 神经元属于葡萄糖敏感型神经元, 血糖的下降可以刺激下丘脑外侧区(lateral hypothalamus area, LHA)的 orexin-A 神经元。但是低血糖应激状态下 orexin-A 的表达变化如何, orexin-A 与胰岛素之间的相互影响并不清楚。本实验采用胰岛素诱导的急性低血糖大鼠模型, 研究下丘脑 orexin-A 的表达变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠抗 orexin-A 抗体购自英国 Abcam 公司; 生物素标记的驴抗小鼠血清购自美国 Chemicon 公司; AB 复合物购自美国 Vector 公司; DAB 显色剂试剂盒、显影液和封片剂购自中国北京中杉公司。

1.2 实验动物和分组

健康成年 SD 大鼠 24 只(雄性, 250~300 g), 由延安大学医学院实验动物中心提供, 随机分为三组($n=8$)。低血糖进食组大鼠皮下注射胰岛素(50 U/kg), 自由进食和饮水; 低血糖禁食组大鼠皮下注射胰岛素(50 U/kg), 禁食 5 h, 但可自

由饮水; 正常对照组大鼠不予任何处理, 动物正常进食、饮水。

1.3 灌注与取材

造模 5 h 后, 用 2% 异戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 之后断尾取血用微型血糖仪测定血糖, 用化学发光法检测血清胰岛素水平。补加戊巴比妥钠(至 80 mg/kg)深麻大鼠, 剪开胸骨, 经升主动脉插管, 剪开右心耳, 先用 100 ml 生理盐水快速冲血, 用 4% 多聚甲醛(pH 7.4)持续灌注 1 h 左右, 取脑, 置入 30% 蔗糖溶液(pH 7.4) 4℃ 冰箱过夜。取下丘脑部分(乳头体至视交叉)行冰冻切片。

1.4 免疫组化染色

切片经 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)反复漂洗 3 次; 加入 0.3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶, 正常山羊血清封闭液室温封闭 1 h; 滴加小鼠抗 orexin-A IgG(1:100), 室温孵育过夜; 生物素标记的驴抗小鼠血清(1:200), 室温 4~6 h; AB 复合物(1:200), 室温 1~2 h。以上各步之间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 30 min $\times 3$ 次。经以上孵育后, 用 DAB 显色剂进行呈色、裱片, 第二天乙醇梯度脱水、二甲苯透明、封片。

1.5 灰度值测量和统计学处理

每只动物选取 3 张典型切片进行 orexin-A 阳性神经元的计数及灰度值测量, orexin-A 免疫阳性产物的灰度值测量采用 Photoshop 7.0 分析工具。实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件行 t 检验。

*【基金项目】陕西省教育厅自然科学项目(2013JK0752); 延安大学自然科学专项科研项目(YDQ2013-02)

【收稿日期】2013-12-31 【修回日期】2014-02-21

△【通讯作者】Tel: 13809113052; Email: jkpzhaolin@163.com