

17- β 雌二醇抑制去卵巢大鼠实验性胰岛素抵抗的形成

周寿红^{1,2}, 凌宏艳^{1,2}, 田绍文¹, 刘显庆¹, 王炳香¹, 胡弼¹

(1. 南华大学医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学药学院, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 17- β 雌二醇抑制胰岛素抵抗的形成; 酶法; 去卵巢; 17- β 雌二醇; 胰岛素抵抗; 大鼠

[摘要] 目的 观察 17- β 雌二醇对果糖诱导的去卵巢大鼠胰岛素抵抗的影响。方法 36 只雌性大鼠卵巢切除后用高果糖饲料喂养 8 周, 诱导胰岛素抵抗产生, 然后随机分为模型组、雌激素替代组和溶媒对照组, 另设立正常对照组大鼠 12 只, 用普通饲料喂养 8 周。检测各组大鼠的体重、动脉收缩压、血脂、血清雌二醇、糖耐量、空腹血糖和空腹血清胰岛素水平, 并计算胰岛素敏感指数。结果 与正常对照组相比, 模型组大鼠体重增加 ($P < 0.05$), 收缩压升高 ($P < 0.05$), 血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和空腹血糖均升高 (均 $P < 0.05$), 空腹血清胰岛素水平升高 ($P < 0.01$), 高密度脂蛋白胆固醇降低 ($P < 0.05$), 胰岛素敏感指数降低 ($P < 0.05$), 产生了胰岛素抵抗, 葡萄糖耐量减低 ($P < 0.05$), 胰岛 β 细胞受损; 17- β 雌二醇替代组逆转上述变化, 胰岛素敏感指数增加 ($P < 0.05$), 抑制胰岛素抵抗的产生。结论 17- β 雌二醇能够抑制高果糖饮食诱导的去卵巢大鼠胰岛素抵抗的产生、胰岛 β 细胞的损伤和血脂的异常, 这说明雌性大鼠体内的雌二醇可能是其在高果糖诱导胰岛素抵抗的过程中受到保护的决定因素。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Inhibiting Effect of 17- β Estradiol on Experimental Insulin Resistance in Ovariectomized Rats

ZHOU Shou-Hong^{1,2}, LING Hong-Yan^{1,2}, TIAN Shao-Wen¹, LIU Xian-Qing¹, WANG Bing-Xiang¹, and HU Bi¹

(1. Department of Physiology, School of Medicine, Nanhua University, Hengyang 421001; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Ovariectomized; Fructose; Insulin Resistance; Rats; 17- β Estradiol; Insulin Sensitivity Index

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the inhibiting effect of 17- β estradiol on insulin resistance induced by the high fructose diet in ovariectomized rats. **Methods** Thirty six ovariectomized female Sprague-Dawley (S-D) rats were fed with the high fructose diet for eight weeks to induce insulin resistance. Then they were randomly divided into three groups: the model group, the 17- β estradiol replacement group, the vehicle control group. The normal control group twelve rats were fed with the normal diet for eight weeks. Body weight (BW), systolic blood pressure (SBP), glucose tolerance, plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL) and low density lipoprotein cholesterol (LDL), fasting blood sugar (FBS) and fasting serum insulin (FSI) and insulin sensitivity index (ISI) were measured. **Results** Compared with the normal control group, BW ($P < 0.05$), SBP ($P < 0.05$), the levels of plasma TG, TC, LDL, FBS (all $P < 0.05$) and FSI ($P < 0.01$) were increased significantly and the plasma HDL level was decreased significantly ($P < 0.05$) in the model group. Glucose tolerance was decreased significantly ($P < 0.05$) and injury of pancreatic β -cell was observed in the model group. ISI was decreased significantly ($P < 0.05$) and insulin resistance was arisen in the model group. Compared with the model group, these effects were reversed, ISI was increased significantly ($P < 0.05$) and insulin resistance was inhibited in the 17- β estradiol replacement group. **Conclusion** 17- β estradiol inhibited insulin resistance, injury of pancreatic β -cell and lipid dysbolism induced by the high fructose diet in ovariectomized rats. These findings suggested that estradiol in female rat might provide protection against the effect of the high fructose diet, which caused hypertension, insulin resistance, injury of pancreatic β -cell and lipid dysbolism.

[收稿日期] 2005-02-01

[修回日期] 2005-11-20

[作者简介] 周寿红, 讲师, 博士研究生, 研究方向为心血管生理, 联系电话为 0734-8281635, E-mail 为 zhoushouhong@126.com。凌宏艳, 讲师, 博士研究生, 研究方向为心血管生理, 联系电话为 0734-8283572, E-mail 为 linghongyan@126.com。通讯作者胡弼, 教授, 研究方向为心血管生理, 联系电话为 0734-8282753, E-mail 为 Hu50Bi@hotmail.com。

已有研究表明, 大量糖摄入会导致肌肉和脂肪组织产生胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)。Horton 等^[1]发现高蔗糖喂养成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠可形成典型的胰岛素抵抗, 而高蔗糖喂养成年雌性 SD 大鼠却不能形成胰岛素抵抗。Galipeau 等^[2]也发现雌性大鼠能防止高果糖饮食诱导的高血压和代谢的改变, 但卵巢切除大鼠经高果糖饮食喂

养后能形成高血压和代谢改变等胰岛素抵抗综合征的表现。那么造成这种对高糖饮食的反应在性别上存在差异的原因是什么? 雌性大鼠为什么在高糖饮食诱导胰岛素抵抗的产生中受到保护? 为此我们用高果糖饲料喂养去卵巢大鼠诱导胰岛素抵抗, 观察17- β 雌二醇的替代作用, 探讨雌性大鼠在高糖饮食诱导胰岛素抵抗的产生中受到保护的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

鼠尾动脉血压仪(HX-⑥型)由中南大学湘雅医学院生理学教研室提供, ECG-6511型心电图机由上海KOHDEN医疗仪器厂生产, HITACH717全自动生物化学分析仪由日本日立公司生产, 全自动 γ 计数器由上海第二仪器厂生产。胰岛素放射免疫检测试剂盒与雌二醇放射免疫检测试剂盒由北京东雅生物工程公司提供。17- β 雌二醇为Sigma公司产品, D-果糖由上海生工生物工程有限公司生产, 普通大鼠饲料由南华大学实验动物学部提供。

1.2 动物模型制备和分组

清洁级成年雌性SD大鼠36只, 3个月龄, 体重 220 ± 20 g, 由南华大学实验动物学部提供。大鼠适应性喂养普通饲料1周后, 于术前禁食过夜, 自由饮水; 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 仰面固定, 无菌状态下腹正中切口, 找到双角子宫, 分别沿每侧子宫找到卵巢, 分离周围脂肪组织, 充分暴露卵巢, 在卵巢与子宫相连接处的狭窄部位结扎, 切除卵巢, 分层缝合关闭腹腔。术后未用抗生素, 自然清醒。双侧卵巢切除后随机分成3组: ①模型组(12只); ②17- β 雌二醇替代组(12只): 将17- β 雌二醇溶于无水乙醇中, 配成1 g/L溶液, 按30 μ g/kg体重(生理剂量, 参考Horvath等^[3])用微量注射器进行皮下注射, 每日一次; ③溶媒对照组(12只): 每天给予相同量的无水乙醇皮下注射。以上3组大鼠同时喂养高果糖饲料8周, 高果糖饲料配方参照Reaven等^[4]方法加以改进, 高果糖饲料中3大能量物质按热卡计算: 果糖占60%, 脂肪占11%, 蛋白质占29%。设正常对照组(12只), 大鼠喂养普通饲料8周。大鼠由专人饲养, 自由进食水, 12 h光照, 温度 22 ± 3 $^{\circ}$ C, 每笼6~8只。

1.3 大鼠体重、动脉收缩压、血清雌二醇和胰岛素敏感指数的测定

果糖喂养后第8周末, 各实验组大鼠在清醒状态下用尾套法(尾动脉血压计与心电图机相连)测量

尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP), 用电子称称量体重(body weight, BW)。各组大鼠于实验前禁食、禁水12 h, 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 仰面固定, 打开胸腔, 充分暴露心脏, 用16号针头直接从心尖插入左心室采血制备血清。放射免疫法测定血清雌二醇(estradiol, E_2)浓度; HITACH717全自动生物化学分析仪测定空腹血糖(fasting blood sugar, FBS)、血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平; 放射免疫法测定空腹胰岛素(fasting serum insulin, FSI)水平, 按照李光伟等^[5]方法计算胰岛素敏感指数ISI(insulin sensitive index, ISI), $ISI = -\ln(FBS \times FSI)$, 当 $ISI \leq -4.88$ 说明存在胰岛素抵抗。

1.4 糖耐量试验

果糖喂养后第8周末, 参考文献[6]方法, 大鼠空腹过夜后次日上午, 从尾动脉采血0.4 mL作对照血样本, 之后按2 g/kg体重的剂量给每只大鼠腹腔注射50%葡萄糖, 并在第15 min、30 min、60 min、90 min和120 min分别从各组大鼠尾动脉采集血液0.4 mL, 立即离心, 置-4 $^{\circ}$ C冰箱, 用于分析血糖和血清胰岛素。HITACH717全自动生物化学分析仪测定血糖浓度, 放射免疫法测定血清胰岛素浓度。

1.5 统计学处理

所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差齐性检验后, 组间差异采用单因素方差分析(ANOVA-oneway), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、动脉收缩压、血清雌二醇和胰岛素敏感指数的比较

与正常对照组相比, 模型组大鼠体重、收缩压和FBS水平均显著升高(均 $P < 0.05$), FSI水平非常显著性升高($P < 0.01$), ISI显著性降低($P < 0.05$), 血清雌二醇水平非常显著性降低($P < 0.01$)。与模型组相比, 雌二醇替代组大鼠体重、收缩压和FBS水平均显著性降低(均 $P < 0.05$), FSI水平非常显著性降低($P < 0.01$), ISI显著性升高($P < 0.05$), 血清雌二醇水平非常显著性升高($P < 0.01$), 而与正常对照组差异无显著性。溶媒对照组与模型组相比以上指标差异无显著性(表1)。

表 1. 各组大鼠体重、动脉收缩压、血清雌二醇和胰岛素敏感指数的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

分 组	体重 (g)	收缩压 (mm Hg)	FBS (mmol/L)	FSI (mu/L)	ISI	E ₂ (pmol/L)
正常对照组	274 ± 22	118.5 ± 7.1	5.8 ± 1.2	19.6 ± 6.5	-4.7 ± 0.7	72.5 ± 15.3
模型组	315 ± 27 ^a	164.7 ± 6.5 ^a	7.3 ± 1.3 ^a	67.0 ± 11.4 ^a	-6.2 ± 0.5 ^a	15.8 ± 6.9 ^b
溶媒对照组	318 ± 35	166.5 ± 5.0	7.3 ± 1.1	68.2 ± 14.7	-6.2 ± 0.4	17.5 ± 6.9
雌激素替代组	268 ± 30 ^c	121.3 ± 4.1 ^c	5.1 ± 0.6 ^c	17.5 ± 8.5 ^d	-4.5 ± 0.4 ^c	69.7 ± 17.4 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.2 各组大鼠血脂水平的比较

与正常对照组相比, 模型组大鼠 TG、TC 和 LDL-C 水平均升高 ($P < 0.05$), HDLC 显著性减低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 雌二醇替代组大鼠 TG、TC 和 LDL-C 水平均降低 ($P < 0.05$), HDLC 显著性增加 ($P < 0.05$)。溶媒对照组与模型组各项指标差异无显著性(表 2)。

表 2. 各组大鼠血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

分 组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
正常对照组	1.45 ± 0.18	1.47 ± 0.17	0.85 ± 0.20	0.20 ± 0.12
模型组	2.16 ± 0.34 ^a	1.58 ± 0.26 ^a	0.56 ± 0.13 ^a	0.43 ± 0.15 ^a
溶媒对照组	2.05 ± 0.28	1.61 ± 0.24	0.54 ± 0.11	0.38 ± 0.12
雌激素替代组	1.41 ± 0.23 ^b	1.36 ± 0.14 ^b	0.83 ± 0.21 ^b	0.20 ± 0.08 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

表 3. 各组大鼠糖耐量试验中血糖的变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n=12$)

分 组	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
正常对照组	5.31 ± 0.72	9.14 ± 0.59	12.65 ± 1.57	12.02 ± 2.46	8.34 ± 0.67	6.38 ± 1.24
模型组	6.80 ± 0.88	24.27 ± 3.17	22.87 ± 2.36	19.07 ± 1.63	18.83 ± 3.37 ^a	15.24 ± 2.41 ^a
溶媒对照组	6.93 ± 1.24	25.40 ± 3.24	20.80 ± 3.38	17.40 ± 1.83	16.75 ± 2.16	14.26 ± 1.05
雌激素替代组	5.75 ± 0.76	10.17 ± 0.82	12.55 ± 0.79	11.10 ± 2.06	9.50 ± 1.34 ^b	6.75 ± 0.43 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

表 4. 各组大鼠糖耐量试验中血清胰岛素浓度的变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n=12$)

分 组	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
正常对照组	15.13 ± 3.46	36.17 ± 5.31	74.75 ± 16.26	50.43 ± 12.37	29.68 ± 8.65	21.35 ± 7.47
模型组	21.38 ± 5.14	25.24 ± 11.32 ^a	29.56 ± 7.21 ^a	36.38 ± 13.45 ^a	48.89 ± 12.38 ^a	48.56 ± 18.37 ^a
溶媒对照组	19.45 ± 7.36	20.96 ± 5.43	28.34 ± 11.07	38.02 ± 14.62	50.93 ± 14.67	49.35 ± 16.29
雌激素替代组	17.16 ± 5.34	40.75 ± 9.45 ^b	71.84 ± 15.20 ^b	54.53 ± 10.37 ^b	23.40 ± 4.68 ^b	19.43 ± 4.27 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨论

目前认为胰岛素抵抗是启动心血管疾病和某些代谢性疾病发生的初始原因之一, 普遍存在于许多病理状态之中, 常常表现为胰岛素敏感性下降、高胰

2.3 17-β 雌二醇对大鼠糖耐量的影响

与正常对照组相比, 模型组血糖均显著升高(均 $P < 0.05$), 在 15 min 时血糖达到高峰。正常对照组血糖在 30 min 时达到高峰, 120 min 时血糖开始恢复到接近空腹水平。与模型组相比, 雌二醇替代组在各时间点血糖水平显著性降低(均 $P < 0.05$), 与正常对照组在各时间点血糖水平差异无显著性。溶媒对照组与模型组相比在各时间点血糖水平差异无显著性(表 3)。正常对照组在 30 min 时有一胰岛素分泌急性相高峰出现, 而模型组胰岛素分泌急性相缺失, 在 90 min 和 120 min 时显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)。雌二醇替代组与正常对照组在各时间点胰岛素水平差异无显著性。溶媒对照组与模型组在各时间点胰岛素水平差异无显著性(表 4)。

胰岛素血症、高血压、糖、脂肪代谢紊乱和内皮功能紊乱等^[7], 因此 1988 年美国学者 Reaven 把以胰岛素抵抗为基础的各种疾病的征候群总称为胰岛素抵抗综合征(syndrome of insulin resistance, SIR)。已有研究

表明高果糖饮食可导致胰岛素抵抗的产生,其具体机制还不清楚,可能与胰岛素信号传导障碍、 β 细胞损伤、交感神经活性增加、血管舒缩功能障碍和内分泌细胞分泌功能障碍等有关^[8,9]。然而 Galipeau 等^[2]发现高果糖饮食喂养的正常雌性大鼠没有出现动脉血压升高和胰岛素抵抗,卵巢切除大鼠尽管体内雌二醇水平非常低,但也没有出现动脉血压升高和IR,而加高果糖饮食喂养后的卵巢切除大鼠则出现了收缩压的升高和胰岛素抵抗,这说明去卵巢大鼠胰岛素抵抗的产生是体内性激素不足和高果糖饮食喂养共同作用的结果。本实验显示大鼠卵巢切除后高果糖喂养导致动脉收缩压升高、高胰岛素血症、胰岛素敏感性降低($ISI < 4.88$)、糖耐量减低,说明存在外周胰岛素抵抗,但是同时给予生理剂量的17- β 雌二醇却阻止了上述改变的发生,这提示生理剂量的17- β 雌二醇能拮抗高果糖饮食诱导胰岛素抵抗产生的效应。

体内胰岛素敏感性和胰岛素分泌是负反馈关系,由于高糖的毒性作用损伤胰岛 β 细胞使胰岛素的分泌减少,加重了胰岛素抵抗^[10]。本实验显示高果糖诱导的去卵巢胰岛素抵抗大鼠在糖耐量试验中胰岛素分泌的急性相缺失,说明高果糖喂养损伤了去卵巢大鼠的胰岛 β 细胞;而给予生理剂量17- β 雌二醇替代后恢复胰岛素分泌的急性相,说明17- β 雌二醇能保护高果糖饮食导致的胰岛 β 细胞的损伤。

胰岛素抵抗导致脂质代谢紊乱的机制有^[11,12]:

胰岛素抵抗时,胰岛素抑制生成游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)作用下降,使血FFA中增多,进入肝脏的FFA也增多,使肝脏合成及释放VLDL、TG增多;④胰岛素抵抗时,脂蛋白脂酶活性下降,使VLDL、TG清除减少。研究表明雌激素能够调节脂质代谢,马虹宇等^[13]报道雌二醇能够增加血浆载脂蛋白A1的含量,降低血清TC、TG,调节脂质代谢。刘彤等^[14]也报道雌激素能够改善脂质代谢,降低LDLC,升高HDLc而防止动脉粥样硬化的形成。本实验显示高果糖诱导的去卵巢胰岛素抵抗大鼠其血清TG、TC、LDLC和体重显著增加,而血清HDLc显著降低;给予生理剂量17- β 雌二醇替代后TG、TC、LDLC和体重显著降低,HDLc显著升高。这说明17- β 雌二醇能够纠正高果糖饮食诱导的去卵巢胰岛素抵抗大鼠脂质代谢的异常。然而目前关于雌激素对脂质代谢的影响仍存争议,戴如春等^[15]发现给去

卵巢的大鼠注射小剂量(10 $\mu\text{g/kg}$ 体重)的雌二醇,尽管可升高HDL,但同时也升高了TG和TC。这可能与雌激素的剂量和作用时间的长短以及雌激素的种类等有关。

总之,以上结果提示雌性大鼠体内的雌二醇可能是其在高果糖饮食诱导胰岛素抵抗的产生中受到保护的原因。雌激素对胰岛素抵抗的影响很复杂,其机制涉及多方面,今后还需要从分子生物学水平,深入探讨雌激素对胰岛素抵抗的影响的机制。

[参考文献]

- [1] Horton TJ, Gayles EC, Prach PA, Koppenhafer TA, Pagliassotti MJ. Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1997, **272** (1): 1571-576
- [2] Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283** (6): 2478-484
- [3] Horvath KM, Hartig W, Van der Veen R, Keijser JN. 17 β estradiol enhances cortical cholinergic innervation and preserves synaptic density following excitotoxic lesions to the rat nucleus basalis magnocellularis[J]. *Neuroscience*, 2002, **110** (3): 489-504
- [4] Reaven GM, Ho H, Hoffman BB. Effects of a fructose-enriched diet on plasma insulin and triglyceride concentration in SHR and WKY rats[J]. *Horm Metab Res*, 1990, **22** (7): 363-365
- [5] 李光伟, 潘孝仁. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1993, **32** (10): 656-660
- [6] 凌宏艳, 胡弼, 吴端生, 王宗保, 文金生, 周寿红. 实验性X综合征大鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2005, **13** (1): 45-47
- [7] Robinson LE, Graham TE. Metabolic syndrome, a cardiovascular disease risk factor: role of adipocytokines and impact of diet and physical activity[J]. *Can J Appl Physiol*, 2004, **29** (6): 808-829
- [8] 席守民, 廉馨, 王宗保, 张秋菊, 唐朝克, 王佐, 等. 高脂高蔗糖饲料诱导贵州小香猪发生糖尿病和动脉粥样硬化病变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 5-11
- [9] Kang DG, Moon MK, Sohn EJ, Lee DH, Lee HS. Effects of morin on blood pressure and metabolic changes in fructose-induced hypertensive rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, **27** (11): 1779-783
- [10] Poirout V, Robertson RP. Minireview: Secondary beta cell failure in type 2 diabetes a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity[J]. *Endocrinology*, 2002, **143** (2): 339-342
- [11] 赵旭燕, 李玉明, 王波. 胰岛素抵抗高血压大鼠胰岛素抵抗和血清瘦素水平对血脂的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 656-658
- [12] Xita N, Georgiou A, Chatzikiriakidou A, Vounatsou M, Papassotiropoulos GP, Papassotiropoulos I, et al. Effect of Adiponectin Gene Polymorphisms on Circulating Adiponectin and Insulin Resistance Indexes in Women with Polycystic Ovary Syndrome[J]. *Clin Chem*, 2004, **8** (2): 456-463
- [13] 马虹宇, 曹兴福, 王京花, 张丽敏. 雌二醇对雌性大鼠血清载脂蛋白A1和B含量的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (2): 156-158
- [14] 刘彤, 沈璐华. 雌激素抑制去卵巢家兔实验性主动粥样硬化的形成[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 321-324
- [15] 戴如春, 廖二元, 杨川, 伍贤平, 苏欣, 彭建. 小剂量17- β 雌二醇对去卵巢大鼠骨密度、血脂及血脂的作用[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, **20** (2): 155-157

(此文编辑 朱雯霞)