

[文章编号] 1007-3949(2009)17-05-0383-04

• 实验研究 •

罗格列酮通过上调脂肪脂联素及其受体的表达 改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗

郑志民^{1,3}, 刘显庆², 周寿红², 凌宏艳², 张伟², 胡弼²
(南华大学 1 药理学教研室, 2 生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001;
3 永州职业技术学院医学院药理学教研室, 湖南省永州市 425006)

[关键词] 罗格列酮; 去卵巢大鼠; 胰岛素抵抗; 脂联素; 脂联素受体

[摘要] 目的 研究罗格列酮对去卵巢大鼠胰岛素抵抗和脂肪中脂联素及其受体表达的影响, 为噻唑烷二酮类药物用于防治绝经后 2 型糖尿病提供实验依据。方法 36 只 SD 雌性大鼠, 随机分为假手术组、去卵巢组和去卵巢 + 罗格列酮组; 检测各组大鼠体重、血压和胰岛素敏感指数的变化。测量内脏脂肪重量, 计算体脂含量; 逆转录聚合酶链反应检测内脏脂肪中脂联素、脂联素受体的表达。结果 与假手术组相比, 去卵巢组大鼠内脏脂肪含量和血压显著增加, 胰岛素敏感指数显著降低, 内脏脂肪中脂联素、脂联素受体表达显著降低; 罗格列酮逆转了上述变化。结论 去卵巢大鼠胰岛素抵抗可能与脂肪脂联素及其受体的表达下调有关; 罗格列酮能够上调脂肪脂联素及其受体的表达而改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Rosiglitazone Improves Insulin Resistance by Up-Regulating the Expressions of Adiponectin and Its Receptors in the Adipose Tissue in Ovariectomized Rats

ZHENG Zhimin^{1,3}, LIU Xianqing², ZHOU Shouhong², LING Hongyan², ZHANG Wei², and HU Bi²

(1 Department of Pharmacology, 2 Department of Physiology, University of South China, Hengyang 421001; 3 Department of Pharmacology, School of Medicine, Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425006 China)

[KEY WORDS] Rosiglitazone; Ovariectomized Rats; Insulin Resistance; Adiponectin; Adiponectin Receptors

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of rosiglitazone on insulin resistance and the expression of adiponectin and its receptors in the adipose tissue in ovariectomized rats. **Methods** Thirty-six female Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: the sham control group, the ovariectomized group and the ovariectomized + rosiglitazone group. The changes of insulin sensitive index (ISI), blood pressure were measured. The content of visceral adipose depots was observed. The expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in the visceral adipose tissue were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with the sham control group, the blood pressure and the content of visceral adipose depots were significantly increased, ISI was significantly decreased, and the expressions of adiponectin and AdipoR1/R2 in visceral adipose were significantly decreased in the ovariectomized rats. Compared with the ovariectomized group, these effects were reversed by rosiglitazone in the ovariectomized + rosiglitazone group. **Conclusion** Rosiglitazone improved insulin resistance by up-regulating the expression of adiponectin and its receptors in the adipose tissue in ovariectomized rats.

绝经后 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发生率明显上升, 普遍认为这主要与绝经后女性雌激素水平降低有关^[1,2], 但以往雌激素替代治疗却远未达到预期结果。有证据显示绝经后机体存在明显的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[3,4]。有理由相信, 改善 IR 应有助于防治该病。脂联素是

主要由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子, 在细胞葡萄糖和脂肪酸等能量代谢过程中发挥重要的调节作用。近年来研究表明, 脂联素 (adiponectin, APN)、脂联素受体 (adiponectin receptor1 and adiponectin receptor2, AdipoR1 和 AdipoR2) 的改变与 T2DM 等代谢性疾病的发生和发展密切相关。噻唑烷二酮类药物 (thiazolidinediones, TDZ) 是过氧化物增殖物激活型受体 γ (peroxisome-proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 的特异性激动剂^[5]。已有研究充分表明 TDZ 可明显增强脂肪、肝脏和骨骼肌对胰岛素的敏感性, 促进保护性脂肪因子 APN 的表达分

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-10

[作者简介] 郑志民, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为 2 型糖尿病发病机制及其药物防治, 联系电话为 13874710953, E-mail 为 yaolizmi@yahoo.cn。通讯作者胡弼, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为 2 型糖尿病发病机制及其药物防治, E-mail 为 hubishengli@yahoo.com.cn。

泌,显著改善整体 IR,降低多种心血管危险因素如降低血压、改善血脂紊乱和降低炎症反应等^[6]。本实验用去卵巢大鼠模拟绝经后状态,检测 TZD 代表药罗格列酮对去卵巢大鼠 IR 相关指标的影响,并检测了大鼠肾周脂肪 APN、AdipoR1 和 AdipoR2 的表达情况,探讨罗格列酮能否改善去卵巢大鼠 IR 及其可能机制,为 TZD 类药物用来防治绝经后 T2DM 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

胰岛素放免法检测试剂盒和雌二醇放免法检测试剂盒购于北京东雅生物工程公司;罗格列酮购于浙江万马药业有限公司;逆转录 cDNA 合成试剂盒、Mark 购于 Fementas 公司,即用 PCR 扩增试剂盒、引物购于上海生工。鼠尾动脉血压仪 (HX 型) (中南大学湘雅医学院生理学教研室研制),HITACHI 717 全自动生化分析仪 (日本日立公司),全自动放射免疫 γ 计数仪 (上海第二仪器厂),Hema480 型 PCR 仪 (珠海黑马医学仪器有限公司),凝胶成像分析系统 (美国 VULTRA-VIOLET 公司),UV240IPC 紫外分光光度仪 (日本岛津公司)。

1.2 动物模型制备和分组

将 36 只清洁级 3 月龄雌性 SD 大鼠 (体重 200 \pm 20 g 购于中南大学湘雅医学院动物学部)随机分为假手术组、去卵巢组和罗格列酮组,每组动物 12 只。各组经戊巴比妥钠腹腔麻醉后,背位固定,腹正中切口,沿子宫双角找到双侧卵巢并充分暴露,去卵巢组和罗格列酮组大鼠切除双侧卵巢,而假手术组则不切除卵巢,分层缝合。各组分笼喂养 (每笼 6 只),均喂以普通饲料 (南华大学动物学部生产),同时罗格列酮组大鼠饮水中加入罗格列酮 5 mg/(kg \cdot d),并相对限制饮水,以确保每日药量的摄入,余两组饮水不限。于 24 周时,大鼠脱颈处死,迅速提取肾周内脏脂肪组织,液氮速冻后,保存于 -80°C 冰箱用于 RT-PCR 检测 APN、AdipoR1 及 AdipoR2 的表达。

1.3 大鼠体重、动脉收缩压、血清雌二醇、胰岛素敏感指数、内脏脂肪重量及体脂含量的测定

实验动物于手术前和手术后 1 周采用剪尾法取清晨空腹血用雌二醇放免法检测试剂盒检测大鼠血清雌二醇浓度。实验第 24 周动物空腹过夜后,于次日清晨 7~9 时测量收缩压。首先将大鼠在 38°C 箱中预热 10 min,用尾-套法 (尾动脉血压仪与心电

图机相连)测量大鼠尾动脉的收缩压。每只大鼠测三次,取平均值。用电子天平称量大鼠体重。脱颈处死大鼠,取静脉血,采用 HITACHI 717 全自动生化分析仪测定空腹血糖 (fasting blood glucose FBG),放射免疫法测定空腹血清胰岛素 (fasting serum insulin FSI),按照李光伟等^[7]方法计算胰岛素敏感指数 (insulin sensitive index ISI), $ISI = -\ln(FBS + FSI)$ 。迅速提取大鼠内脏脂肪组织 (包括肠系膜上及肾周),用精密电子天平准确称重,计算体脂含量 (内脏脂肪重量与体重之比)。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测脂肪脂联素及其受体表达

根据文献报道及基因库收录序列,用 Primer3 软件设计所需检测基因的引物。设计的引物通过 Intemet 网络检查引物与基因库之间的同源性。引物由上海生工公司合成。总 RNA 的提取按 BBI 公司 TRIZOL 试剂盒说明操作,引物序列为: GAPDH^[8] 上游引物为 5'-AGT TCA ACG GCA CCA GTC AAA G-3',下游引物为 5'-TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC-3',产物长度为 119 bp APN^[9] 上游引物为 5'-CAG AAT CAT TAT GAC GGC AGC AC-3',下游引物为 5'-AGA CTT GGT CTC CCA CCT CCA-3',产物长度为 218 bp AdipoR1 上游引物为 5'-CCA CCA TGC CAT GGA GAA G-3',下游引物为 5'-ATA TTT GGT CTG AGC ATG GTC AAG-3',产物长度为 300 bp AdipoR2^[8] 上游引物为 5'-GGA GCC ATT CTC TGC CTT TC-3',下游引物为 5'-ACC AGA TGT CAC ATT TGC CA-3',产物长度为 468 bp。PCR 反应条件 94°C 预变性 5 min,94°C 变性 30 s,58°C (AdipoR1 为 60°C,AdipoR2 为 61°C) 退火 45 s,72°C 延伸 40 s,35 个循环后 72°C 延伸 5 min,4°C 保存。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察,摄片,并用软件分析测定目的带灰度值。

1.5 统计分析

应用 SPSS10.0 软件包进行统计分析,各统计指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢切除术前后血清雌二醇浓度变化

卵巢切除术前 (0 周) 各组大鼠血清雌二醇浓度差异无显著性。卵巢切除术后 (1 周),与假手术组相比,去卵巢组和罗格列酮组大鼠血清雌二醇水平显著降低 ($P < 0.01$);而去卵巢组与罗格列酮组之

间大鼠血清雌二醇水平差异无显著性(表 1)。

表 1 卵巢切除术对血清雌二醇浓度 ($\mu\text{mol/L}$)的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

| 周次 | 假手术组 | 去卵巢组 | 罗格列酮组 |
|----|---------------|---------------------------|---------------------------|
| 0周 | 70.25 ± 18.13 | 72.43 ± 12.64 | 74.69 ± 15.07 |
| 1周 | 71.84 ± 14.52 | 14.18 ± 4.72 ^a | 13.85 ± 5.61 ^a |

a为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

2.2 罗格列酮对去卵巢大鼠体重、内脏脂肪重量、体脂含量、收缩压、空腹血糖、空腹血清胰岛素和胰岛素敏感指数的影响

与假手术组相比较, 去卵巢组大鼠体重、内脏脂肪重量、体脂含量、收缩压和 FSI 浓度显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ISI 显著下降 ($P < 0.01$), FBG 差异无显著性 ($P > 0.05$)。与去卵巢组相比较, 罗格列酮组大鼠内脏脂肪重量、体脂含量、收缩压和 FSI 浓度显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但体重和 ISI 却明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), FBG 差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 2)。

表 2 各组大鼠体重、内脏脂肪重量、体脂含量、动脉收缩压、空腹血糖、血清胰岛素和胰岛素敏感指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

| 参数 | 假手术组 | 去卵巢组 | 罗格列酮组 |
|-------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|
| 体重 (g) | 250.6 ± 13.4 | 277.5 ± 12.6 ^b | 315.7 ± 14.3 ^c |
| 内脏脂肪 (g) | 15.3 ± 4.2 | 22.5 ± 3.0 ^b | 17.4 ± 2.6 ^d |
| 体脂含量 (mg/g) | 61.1 ± 4.8 | 81.2 ± 4.3 ^b | 55.0 ± 3.5 ^d |
| 收缩压 (mmHg) | 128.0 ± 5.0 | 152.0 ± 6.0 ^a | 130.0 ± 3.0 ^c |
| FBG (mmol/L) | 5.46 ± 0.27 | 6.07 ± 0.61 | 5.62 ± 0.30 |
| FSI ($\mu\text{u/L}$) | 17.51 ± 5.57 | 64.62 ± 10.22 ^a | 27.35 ± 8.46 ^c |
| ISI | -4.56 ± 0.22 | -5.97 ± 0.24 ^b | -5.04 ± 0.20 ^d |

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$, 与去卵巢组比较。

2.3 罗格列酮对去卵巢大鼠内脏脂肪脂联素及其受体表达的影响

与假手术组相比, 去卵巢组内脏脂肪 APN 及 AdipoR1/R2 表达均显著下降 ($P < 0.01$); 与去卵巢组相比, 罗格列酮组内脏脂肪 APN 及 AdipoR1/R2 表达均显著上调 ($P < 0.01$; 表 3 和图 1)。

3 讨论

研究显示以高血压、冠心病、动脉粥样硬化、血脂紊乱、高胰岛素血症和 2 型糖尿病等为主要表现的代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 在女性绝经

表 3 罗格列酮对去卵巢大鼠内脏脂肪脂联素及其受体表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

| 分组 | APN | AdipoR1 | AdipoR2 |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 1.78 ± 0.19 | 0.86 ± 0.13 | 0.48 ± 0.09 |
| 去卵巢组 | 0.78 ± 0.08 ^a | 0.52 ± 0.07 ^a | 0.19 ± 0.05 ^a |
| 罗格列酮组 | 3.19 ± 0.22 ^b | 2.26 ± 0.15 ^b | 2.08 ± 0.13 ^b |

a为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b为 $P < 0.01$, 与去卵巢组比较。

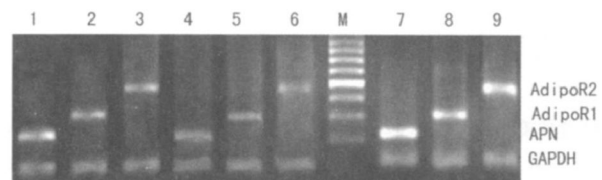


图 1 罗格列酮对去卵巢大鼠内脏脂肪脂联素及其受体表达的影响 1、2、3为假手术组, 4、5、6为去卵巢组, 7、8、9为罗格列酮组。

后发病率明显增加^[10-12], 而代谢综合征的核心是胰岛素抵抗。本实验显示大鼠卵巢切除后出现动脉血压增高、高胰岛素血症、胰岛素敏感指数下降, 说明存在外周胰岛素抵抗, 而同时给予罗格列酮能阻止上述改变的发生, 这提示罗格列酮能拮抗去卵巢大鼠胰岛素抵抗的发生。内脏脂肪堆积为胰岛素抵抗的重要特征^[13]。罗格列酮在改善胰岛素抵抗的同时明显增加去卵巢大鼠的体重, 这与罗格列酮促使体脂重新分布, 减少内脏脂肪含量, 同时增加皮下脂肪含量有关^[14]。

脂联素是一种由脂肪组织分泌的细胞因子, 具有显著改善胰岛素抵抗和抗动脉粥样硬化的生物效应^[15, 16]。PPAR γ 是调节机体糖脂代谢和脂肪细胞分化最重要的核转录因子, 主要分布于脂肪组织。近年广泛应用于 T2DM 的胰岛素增效剂噻唑烷二酮类药物通过特异性激动 PPAR γ , 明显影响脂肪组织代谢, 调节脂肪因子表达及分泌, 升高脂联素血浆浓度, 降低胰岛素抵抗, 从而发挥改善胰岛素抵抗效应。本实验发现去卵巢大鼠内脏脂肪 APN 表达显著降低, 而罗格列酮能显著上调去卵巢大鼠内脏脂肪 APN 的表达。这提示罗格列酮可能通过上调脂联素的表达而发挥抗胰岛素抵抗的效应。

脂联素受体介导脂联素引起的游离脂肪酸氧化和葡萄糖摄取, 从而改善胰岛素敏感性, 其受体包括 AdipoR1 和 AdipoR2 两种亚型。有研究报道噻唑烷二酮类药物吡格列酮能上调人脂肪细胞脂联素及其受体的表达^[17]。本研究发现, 去卵巢大鼠内脏脂肪

中 AdipoR1和 AdipoR2表达均显著下降,这种改变可能参与了去卵巢后胰岛素抵抗的发生;同时发现罗格列酮能显著上调去卵巢大鼠内脏脂肪 AdipoR1和 AdipoR2的表达。以上实验提示罗格列酮改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗可能与上调脂联素受体的表达有关。

总之,去卵巢大鼠胰岛素抵抗的产生可能与脂肪脂联素及其受体的表达下调有关;而罗格列酮能够改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗,其机制可能与罗格列酮能上调脂肪脂联素及其受体的表达有关。

[参考文献]

- [1] Riant E, Wagenknecht L, Cogo H, et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice [J]. *Endocrinology*, 2009, **13** (3): 235-240
- [2] 孙明晓, 郭立新, 周迎生, 等. 男性及绝经后女性雌激素受体基因多态性与糖尿病大血管病变的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 189-193
- [3] Choi JS, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats [J]. *Nutrition*, 2009, **28** (4): 399-405
- [4] Saengsrisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement [J]. *Metabolism*, 2009, **58** (1): 38-47
- [5] Lazar MA. PPAR gamma 10 years later [J]. *Biochimie*, 2005, **87** (1): 9-13
- [6] Kamers R, Vrana A. Thiazolidinediones--tools for the research of metabolic syndrome X [J]. *Physiol Res*, 1998, **47** (4): 215-225
- [7] 李光伟, 潘孝仁. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指标 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1993, **32** (10): 656-660
- [8] Hsieh WA, Buemmer D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease [J]. *Hypertension*, 2004, **43** (2): 297-305
- [9] Nagasawa A, Fukui K, Kojima M, et al. Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 2003, **311** (4): 909-914
- [10] Wei W, Parvizi N, Tsumura K, et al. Induction of C-reactive protein, serum amyloid P component and kininogens in the submandibular and lacrimal glands of rats with experimentally induced inflammation [J]. *Life Sci*, 2001, **69** (3): 359-368
- [11] Alhaznazi-Perez JC, Blancas-Flores G, Garcia-Macedo R, et al. Leptin and its association with obesity and type 2 diabetes [J]. *Gac Med Mex*, 2008, **144** (6): 535-542
- [12] Rasouli N, Kem PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, **93** (11 Suppl 1): S64-73
- [13] Mathieu P, Pibarot P, Larose E, et al. Visceral obesity and the heart [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40** (5): 821-836
- [14] Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, et al. The PPAR gamma agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, **12** (3): 125-129
- [15] Kawano J, Arora R. The role of adiponectin in obesity, diabetes and cardiovascular disease [J]. *J Cardiol Metab Syndr*, 2009, **4** (1): 44-49
- [16] Shimano H. Obesity and atherosclerosis [J]. *Nippon Rinsho*, 2009, **67** (2): 333-337
- [17] 丁亚琴, 马向华, 沈捷, 等. 吡格列酮对人脂肪细胞中脂联素及其受体 mRNA 表达的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2008, **4** (21): 360-363

(此文编辑 许雪梅)