

文章编号: 1005-8982(2015)36-0007-05

·论著·

持续果糖饮水诱导小鼠胰岛素抵抗机制

徐志伟,常晓彤

(河北北方学院 医学检验学院生化教研室,河北 张家口 075000)

摘要:目的 探讨果糖诱导小鼠胰岛素抵抗机制。方法 小鼠随机分为 3 组,分别为单纯饮水的正常对照组,10%果糖饮水组,10%果糖 + 精氨酸饮水组。实验时间为 4 周,期间,分析血清促胰岛素肽(GIP)和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)水平;4 周后,测定各组小鼠空腹血糖和胰岛素水平,计算胰岛素抵抗指数;分析各组小鼠肝脏活性氧簇(ROS)水平。结果 10%果糖饮水导致小鼠发生胰岛素抵抗,果糖干预不影响小鼠血清 GIP 和 GLP-1 水平,但肝脏组织 ROS 水平升高($P < 0.05$);10%果糖 + 精氨酸饮水组胰岛素抵抗指数没有显著变化,血清 GLP-1 水平升高,肝脏组织 ROS 水平没有显著变化。结论 10%果糖饮水使小鼠肝脏组织 ROS 水平升高,而血清 GLP-1 水平不升高,无法发挥 GLP-1 对肝脏的保护作用,最终升高的 ROS 引起小鼠胰岛素抵抗。

关键词: 果糖;小鼠;胰岛素抵抗;ROS;肠激素

中图分类号: R363.14;R-332

文献标识码: A

Mechanism of insulin resistance in mice induced by continuous fructose solution drinking

Zhi-wei XU, Xiao-tong CHANG

(Department of Biochemistry, North University of Hebei, Zhangjiakou, Hebei 075000, P.R. China)

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of insulin resistance in mice induced by fructose solution drinking. [Methods] Mice were randomly assigned into 3 groups including normal control group, 10% fructose group and 10% fructose + arginine group. All the groups were treated for 4 weeks. Serum glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide (GIP) levels were analyzed during the treatment. After 4 weeks, fasting blood glucose and serum insulin levels were determined, index of insulin resistance was calculated by HOMA-IR, and liver reactive oxygen species (ROS) level was measured. [Results] Drink of 10% fructose induced insulin resistance, significantly elevated the index of insulin resistance and liver ROS level compared to the control group ($P < 0.05$); whereas the levels of serum GLP-1 and GIP were not significantly different from those of the control group. However, in 10% fructose + arginine group, the index of insulin resistance was not significantly different from that of the control group although it was higher, serum GLP-1 elevated significantly compared with that of the control group ($P < 0.05$), the liver ROS level was not significantly different from that of the control group. [Conclusions] Drinking 10% fructose may result in increased ROS level in liver tissue without elevating serum GLP-1 level; so the toxic effect of ROS can not be prevented by GLP-1, leading to insulin resistance in mice.

Key words: fructose; mouse; insulin resistance; ROS; gut hormone

自从上世纪 50 年代以来,一系列研究表明果糖能够在实验大鼠诱导胰岛素抵抗,单独果糖摄入或

在饲料中添加果糖一直被应用于胰岛素抵抗实验动物模型的制备。研究显示,果糖的摄入也可以诱导

收稿日期:2015-07-03

[通信作者] 常晓彤, Tel: 18931316309; E-mail: changxt1212@vip.sina.com

· 7 ·

实验大鼠代谢综合征的所有特征,及氧应激、内皮细胞的功能紊乱、脂肪肝、微量清蛋白尿和肾病^[1]。几个临床研究观察了高果糖饮食与胰岛素抵抗的关系,FAEH 等发现健康男性每日 3 g/kg 果糖的补充可以显著导致肝脏胰岛素抵抗^[2],AEBERLI 在健康男性青年的研究也得到同样的结果,果糖摄入使肝脏葡萄糖合成增加^[3]。随着果糖,特别是高果糖的玉米糖浆在食品领域的广泛应用,食物果糖摄入的增加被认为与人类肥胖、2 型糖尿病、代谢综合征及高血压人数的增加相关^[4]。

肠道是机体最大的激素分泌器官,碳水化合物、脂类、蛋白质在肠道的出现能够促进许多肠激素的分泌。研究证实,肠激素不仅调节胃肠道的运动、分泌和吸收,也通过神经系统调节诸多生理活动。肠激素中胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide, GLP-1)、葡萄糖依赖性促胰岛素释放肽 (glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP) 是广为熟知的两种肠激素,它们能够刺激胰岛素分泌。研究表明, GLP-1 在肝脏也阻止氧化应激、内质网应激、炎症因子对肝细胞的毒性作用^[5]。GLP-1 和 GIP 可以阻止细胞因子、糖毒性、内质网应激、过氧化氢、链尿佐菌素对 β 细胞的毒性作用,及严重肥胖引起的细胞凋亡^[6]。该事实提示,伴随食物消化吸收分泌的 GIP 和 GLP-1 对机体组织也具有保护作用,可以阻止过量摄食对机体组织的损害。作为营养成分之一,果糖摄取引起的胰岛素抵抗是否与肠激素 GIP 和 GLP-1 相关未见报道,本研究对实验小鼠持续给予果糖饮水喂养,观察小鼠胰岛素抵抗、血清 GIP 和 GLP-1 水平变化及组织活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 浓度,以探讨果糖诱导胰岛素抵抗的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 4 周龄雄性昆明小鼠,体重(20 ± 2)g,由首都医科大学提供,生产许可证号:SCXK(京 2014-00 04)。

1.2 主要试剂与药物

葡萄糖测定试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司,胰岛素 ELISA 测定试剂盒、GIP、GLP-1 ELISA 测定试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,ROS 化学荧光法测试盒、蛋白定量考马斯亮蓝法测试盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物分组及实验处理

适应性喂养后,将实验小鼠随机分为 3 组,每组 20 只,分别为不添加果糖的单纯饮水喂养小鼠组(正常对照组);10%果糖饮水处理小鼠组;10%果糖 + 精氨酸(Arg,每 100 ml 添加精氨酸盐酸盐 10 g)饮水喂养小鼠组;各实验组喂养 4 周,期间自由饮水,自由进食标准饲料。期间进行小鼠血清 GIP、GLP-1 水平分析。4 周后,去除干预 24 h,进行各项其他指标分析。

1.4 观察指标及测定方法

1.4.1 血液收集及空腹血糖和血清胰岛素的测定 各实验组小鼠空腹 8 h 后,断尾法采集小鼠尾血,离心(1 088 × g/min, 5 min)制备血清,用于血糖测定或置入 -80℃ 冰箱冷冻保存用于胰岛素测定。血糖测定用葡萄糖氧化酶法试剂盒,20 μ l 血清加 3 ml 酶酚混合试剂,37℃ 保温 15 min,以 722 分光光度计在 505 nm 测定吸光度,按公式计算血糖浓度;胰岛素测定采用小鼠胰岛素酶联免疫分析试剂盒,首先进行空白孔、标准孔、样品孔加样 50 μ l,37℃ 温育 30 min,洗涤拍干后,加入酶标液 50 μ l,空白孔除外,37℃ 温育 30 min,洗涤拍干。每孔加入显色剂 A、B 各 50 μ l,37℃ 避光显色 10 min,每孔加终止液 50 μ l,酶标仪 450 nm 波长测定各孔的吸光度。

1.4.2 胰岛素抵抗采用 Turner 的稳态模型评价法(HOMA-IR)^[7] 胰岛素抵抗指数 = [空腹血糖(mmol/L) × 空腹血清胰岛素(mIU/L)]/22.5。

1.4.3 肝脏组织 ROS 的测定 小鼠处死,立即完整取出肝脏组织,分别称重,按 1 : 20(重量 : 体积)的比例加入匀浆介质(100 mmol/L 磷酸缓冲液),冰水浴条件下机械匀浆,1 000 g 离心 10 min,取上清液。部分上清液用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒测量蛋白含量,0.05 ml 样品加 3 ml 考马斯亮蓝显色液,静置 10 min,以 722 分光光度计在 595 nm 处测定吸光度,计算蛋白质含量;部分上清液用活性氧测定试剂盒(DCFH-DA 法)测定活性氧簇荧光强度,即在 190 μ l 匀浆上清液加入 1 mmol/LDCFH-DA 工作液(即荧光探针)10 μ l,对照孔加入 10 μ l PBS,充分混匀,37℃ 孵育 30 min,在荧光分光光度计以 535 nm 波长测定其荧光强度。结果以荧光强度 / 毫克蛋白表示。

1.4.4 血清 GIP 和 GLP-1 测定 在实验第 2 周,采集各组小鼠血液,制备血清,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存,GIP 和 GLP-1 分析采用 GIP 和 GLP-1 ELISA

试剂盒,按试剂盒说明进行空白孔、标准孔、样品孔加样 $50\ \mu\text{l}$, 37°C 温育 30 min, 洗涤拍干后, 加入酶标液 $50\ \mu\text{l}$, 空白孔除外, 37°C 温育 30 min, 洗涤拍干。每孔加入显色剂 A、B 各 $50\ \mu\text{l}$, 37°C 避光显色 10 min, 每孔加终止液 $50\ \mu\text{l}$, 酶标仪 $450\ \text{nm}$ 波长测定各孔的吸光度。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠空腹血糖和血清胰岛素浓度

实验结束后 24 h, 分析各组小鼠空腹血糖, 3 组小鼠未发现血糖异常, 均在正常范围, 各组间比较差异无统计学意义; 果糖饮水组小鼠胰岛素水平显著增加, 为 $(37.26 \pm 4.25)\text{mIU/L}$, 与正常对照小鼠 $(18.64 \pm 3.62)\text{mIU/L}$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 果糖 + Arg 饮水组小鼠胰岛素水平低于果糖饮水组小鼠 ($P < 0.05$), 虽然高于正常对照组, 但差异有统计学意义, 见附表。

附表 各组小鼠空腹血糖和胰岛素水平 ($n=18, \bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖 / (mmol/L)	血清胰岛素 / (mIU/L)
正常对照组	5.46 ± 0.51	18.64 ± 3.62
果糖组	6.13 ± 0.42	$37.26 \pm 4.25^\dagger$
果糖 + 精氨酸组	5.82 ± 0.47	25.23 ± 3.85

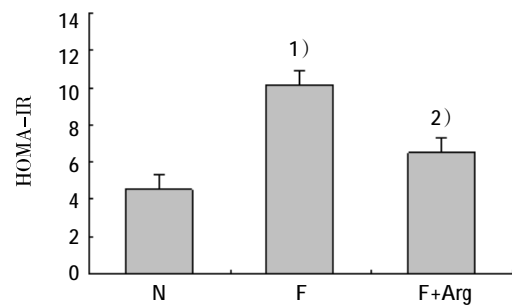
注: \dagger 与正常对照组比较, $P < 0.05$

2.2 各组小鼠胰岛素抵抗指数分析

以稳态模型评价法 (HOMA-IR) 进行的胰岛素抵抗指数分析表明, 果糖饮水组小鼠胰岛素抵抗指数显著升高, 为 (10.15 ± 2.13) , 与正常对照小鼠 (4.52 ± 0.75) 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 果糖 + Arg 饮水组小鼠胰岛素抵抗指数 (6.53 ± 1.86) 低于果糖饮水组小鼠 ($P < 0.05$), 虽然高于正常对照组, 但差异无统计学意义, 见图 1。

2.3 小鼠血清 GIP 和 GLP-1 水平

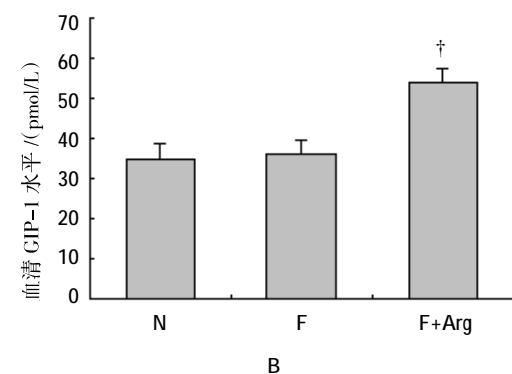
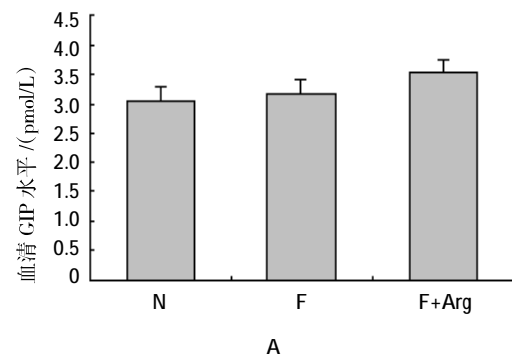
实验期间, 对每组小鼠进行的分析表明, 果糖饮水摄入并没有增加小鼠血清 GIP 和 GLP-1 水平, 分别为 (3.18 ± 0.34) 和 $(36.43 \pm 5.54)\text{pmol/L}$, 正常对照小鼠分别为 (3.06 ± 0.43) 和 $(35.03 \pm 6.68)\text{pmol/L}$, 两组比较差异无统计学意义, 但是果糖 + Arg 组小鼠血



N: 正常对照组; F: 果糖组; F+Arg: 果糖 + 精氨酸组; 1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与果糖组比较, $P < 0.05$

图 1 各组小鼠胰岛素抵抗指数 HOMA-IR

清 GLP-1 水平 $(54.21 \pm 6.25)\text{pmol/L}$ 增加, 与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GIP 无显著增加, 与正常对照组比较差异无统计学意义, 见图 2。

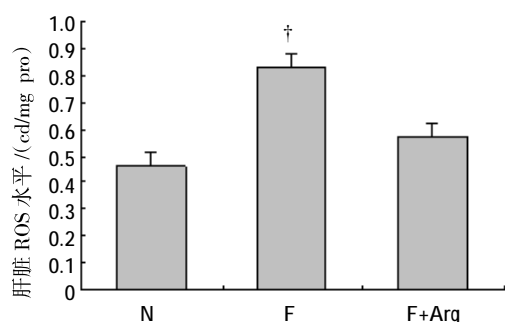


N: 正常对照组; F: 果糖组; F+Arg: 果糖 + 精氨酸组; \dagger 与正常对照组比较, $P < 0.05$

图 2 各组小鼠血清 GIP 和 GLP-1 水平

2.4 小鼠肝脏组织 ROS 水平

果糖饮水组小鼠肝脏组织 ROS 水平 $(0.83 \pm 0.07)\text{cd/mg pro}$ 显著升高, 与正常对照组 $(0.46 \pm 0.08)\text{cd/mg pro}$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 果糖 + Arg 组小鼠肝组织 ROS $(0.57 \pm 0.06)\text{cd/mg pro}$ 稍高于正常组, 但差异无统计学意义, 见图 3。



N: 正常对照组; F: 果糖组; F+Arg: 果糖 + 精氨酸组。† 与正常对照组比较, $P < 0.05$

图 3 化学发光法测定的各组小鼠肝 ROS 水平

3 讨论

与已有的研究一样,本研究使用 10% 的果糖饮水也诱导小鼠的胰岛素抵抗, HOMA-IR 分析显示,小鼠胰岛素抵抗指数显著高于正常对照小鼠。但是在果糖饮水中同时添加精氨酸则显著改善小鼠的胰岛素抵抗,抵抗指数虽然稍高于正常小鼠,但与正常对照小鼠比较,差异无统计学意义。

本研究的上述结果或许与肠道分泌的激素相关。营养物进入体内首先经肠道的消化吸收,并刺激肠激素的分泌,进而调节胃肠道的运动、分泌、吸收及诸多生理活动和保护作用。GLP-1 和 GIP 是肠激素中最重要的两种。虽然 2014 年 KUHRE 的研究指出果糖能够刺激小鼠、大鼠及人的 GLP-1 分泌,不刺激 GIP 的分泌^[9],但本研究中饮水中果糖的缓慢摄入并没有引起小鼠血清 GLP-1 和 GIP 的增加,原因不清。但是,果糖同时添加精氨酸则导致小鼠血清 GLP-1 的显著增加。作为蛋白质分解产物,体外研究显示谷氨酰胺、苯丙氨酸、色氨酸等可以刺激 GLP-1 和 GIP 的分泌^[9], MACE 的研究表明^[10],在各种促 GLP-1 和 GIP 分泌的氨基酸中,作用强度分别为苯丙氨酸 > 精氨酸 > 谷氨酰胺 ~ 色氨酸 > 天冬酰胺。由于苯丙氨酸溶解度低,本研究应用精氨酸添加到果糖饮水中,结果显示精氨酸的加入明显增加了小鼠血清 GLP-1 水平。

为说明血清 GLP-1 增加是如何改善小鼠胰岛素抵抗的,笔者分析肝脏组织的活性氧簇 (ROS) 水平。肝脏是胰岛素受体最密集的脏器之一,对胰岛素促进葡萄糖摄取极为敏感^[11]。ROS 被认为是胰岛素抵抗产生的原因,已有研究表明,ROS 对胰岛素信号传导通路中的胰岛素受体、胰岛素受体底物、磷脂酰

肌醇 3- 激酶、蛋白激酶 B 和葡萄糖转运蛋白均有负面影响^[12]。HOEHN 的研究显示^[13],线粒体超氧化物的产生引起许多培养组织的胰岛素抵抗,呼吸链抑制剂、解偶联剂、超氧化物歧化酶可以逆转胰岛素受体抵抗。

本研究显示,果糖摄入组小鼠肝脏 ROS 显著增加,而果糖添加精氨酸组小鼠肝脏 ROS 虽然高于正常对照,但差异无统计学意义。本研究中,果糖引起的肝脏 ROS 增加与果糖在肝内产生的尿酸相关,果糖在果糖激酶催化下形成 1- 磷酸果糖,该过程迅速且不受反馈抑制,消耗 ATP 产生的 AMP 大量转化为尿酸,并且果糖也刺激氨基酸如甘氨酸生成尿酸,尿酸在包括肝脏组织在内的许多组织细胞可以引起线粒体氧应激^[14]。果糖添加精氨酸组小鼠肝脏 ROS 没有出现明显的升高,或许与精氨酸促进的血清 GLP-1 水平增加相关, FONTANA 指出^[9],GLP-1 在肝脏可以阻止氧化应激、内质网应激、炎症因子对肝细胞的毒性作用。其他研究表明^[15-17],GLP-1 或其类似物可以降低大鼠肝脏氧化应激水平,改善胰岛素抵抗。因此,在果糖添加精氨酸组小鼠胰岛素抵抗的显著改善是由于血清高水平的 GLP-1 在肝脏组织阻止果糖产生的 ROS 毒性作用。

总之,果糖引起的小鼠胰岛素抵抗是由于果糖诱导肝脏组织 ROS 水平增加,但不能同时刺激肠道 GLP-1 和 GIP 的分泌,无法阻止肝脏 ROS 的毒性作用,即果糖逃避 GLP-1 对肝脏的保护作用,通过产生的 ROS 引起胰岛素抵抗。

参 考 文 献:

- [1] JOHNSON RJ, PEREZ-POZO SE, SAUTIN YY, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(1): 96-116.
- [2] FAEH D, MINEHIRA K, SCHWARZ JM, et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men [J]. *Diabetes*, 2005, 54(7): 1907-1913.
- [3] AEBERLI I, HOCHULI M, GERBER PA, et al. Moderate amounts of fructose consumption impair insulin sensitivity in healthy young men: a randomized controlled trial [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(1): 150-156.
- [4] 王兴安, 巫冠中. 果糖的代谢及其对健康的危害[J]. *药学与临床研究*, 2011, 19(3): 244-246.
- [5] FONTANA J, ČERVINKOVÁ Z, ANDĚL M. Effects of GLP-1 on liver[J]. *Vnitr Lek*, 2013, 59(7): 551-558.
- [6] LAVINE JA, ATTIE AD. Gastrointestinal hormones and the reg-

- ulation of β -cell mass[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1212(1): 41-58.
- [7] HAFFNER SM, KENNEDY E, GONZALEZ C, et al. A prospective analysis of the HOMA model, the Mexico city diabetes study [J]. *Diabetes Care*, 1996, 19(10): 1138-1141.
- [8] KUHRE RE, GRIBBLE FM, HARTMANN B, et al. Fructose stimulates GLP-1 but not GIP secretion in mice, rats, and humans[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(7): 622-630.
- [9] TOLHURST G, ZHENG Y, PARKER HE, et al. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca^{2+} and cAMP[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2): 405-413.
- [10] MACE OJ, SCHINDLER M, PATEL S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine[J]. *J Physiol*, 2012, 590 (Pt 12): 2917-2936.
- [11] 陈梦云, 江国荣. 胰岛素抵抗细胞模型研究进展 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(2): 141-142.
- [12] 任春久, 张瑶, 崔为正, 等. 氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J]. *生理学报*, 2013, 65(6): 664-673.
- [13] HOEHN KL, SALMON AB, HOHNEN-BEHRENS C, et al. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(42): 17787-17792.
- [14] JOHNSON RJ, NAKAGAWA T, SANCHEZ-LOZADA LG, et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity[J]. *Diabetes*, 2013, 62(10): 3307-3315.
- [15] 周小俐, 李东风, 徐丽姝. GLP-1 对非酒精性脂肪肝病大鼠胰岛素抵抗及 PKC ϵ 的影响[J]. *中国病理生理学杂志*, 2015, 31(4): 690-694.
- [16] 高慧亭, 徐丽姝, 李东风, 等. GLP-1 对非酒精性脂肪肝病大鼠肝氧化应激及 TNF- α 、TGF- β_1 的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(11): 1661-1664.
- [17] 曾志刚, 徐丽姝, 关丽嫦, 等. 利拉鲁肽对非酒精性脂肪肝病大鼠脂联素及胰岛素抵抗的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(3): 533-537.

(张蕾 编辑)