

追糖溯源

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000712

链脲佐菌素诱导大鼠父代糖尿病引起老年子代胰岛素抵抗

章誉尧¹, 王 恒², 李继斌³, 彭 川², 于 洋¹, 柴水琴¹, 王宏英², 肖晓秋²

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院脂糖代谢实验室, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与食品卫生学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨父代糖尿病对老年子代胰岛素敏感性的影响。**方法:**雄性SD大鼠每组10只,腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型;成模后,挑选符合要求的模型鼠5只与正常雌鼠交配;子鼠断奶后随机挑选10只雄性;监测子鼠体质量、随机血糖和空腹血糖;子鼠老龄期实施高胰岛素正常血糖钳夹实验;检测胰岛素信号通路关键因子蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, Akt)和胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, Irs1)的磷酸化;肝脏油红染色;检测肝脏甘油三酯(triglyceride, TG)含量。**结果:**父代糖尿病组(DM组)血糖(22.60 ± 1.32) mmol/L较对照组(CT组)(5.88 ± 0.13) mmol/L明显升高($P=0.000$);糖尿病子代组(DM-O组)80周体质量(652.0 ± 10.7) g较对照组(CT-O组)(598.0 ± 11.9) g明显升高($P=0.003$);钳夹实验表明DM-O组葡萄糖输注率(6.23 ± 0.30) mg/(kg·min)较CT-O组(8.65 ± 0.43) mg/(kg·min)明显降低($P=0.005$);Western blot结果显示DM-O组胰岛素信号通路关键因子Akt的磷酸化程度(0.0234 ± 0.0044)较CT-O组(0.0598 ± 0.0110)明显降低($P=0.016$),DM-O组Irs1的磷酸化程度(0.2550 ± 0.0306)较CT-O组(0.4520 ± 0.0570)明显降低($P=0.016$);DM-O组肝脏脂质沉积较CT-O组明显增加;DM-O组肝脏TG含量(86.2 ± 10.2) mol/g较CT-O组(61.1 ± 4.71) mol/g明显增加($P=0.046$)。**结论:**父代糖尿病可引起子代体质量增加、老年期胰岛素敏感性降低,胰岛素信号通路激活受限,这一现象可能是由于父代糖尿病引起子代肝脏脂质沉积增加所致。

【关键词】体质量;糖尿病;胰岛素抵抗**【中图分类号】**R587.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-01-23

STZ-induced paternal diabetes in rats contributes to insulin resistance in the aged offspring

Zhang Yuyao¹, Wang Heng², Li Jibin³, Peng Chuan², Yu Yang¹, Chai Shuiqin¹, Wang Hongying², Xiao Xiaoqi²

(1. Institute of Life Science, Chongqing Medical University; 2. Laboratory of Lipid & Glucose Metabolism, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Teaching and Research of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objectives: To investigate the influence of paternal diabetes on insulin sensitivity of the aged offspring. **Methods:** Male SD rats were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) and then mated with healthy female SD rats. Body weight, fed and fasting blood glucose were determined in the offspring. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed to assess insulin sensitivity in the aged offspring. Western blot was implemented to evaluate the following proteins: p-Akt, Akt, p-Irs and Irs in liver tissues. Oil red O staining and liver triglyceride (TG) analysis were employed to evaluate the liver tissues lipidosis. **Results:** Blood glucose levels in STZ-treated male rats (DM) (22.6 ± 1.32) mmol/L were significantly higher than that in control group (CT) (5.88 ± 0.13) mmol/L ($P=0.000$). Body weight analysis showed that the body weight of 80-week-age offspring of paternal diabetic rats (DM-O) (652.0 ± 10.7) g was significantly higher than that in the offspring of control group (CT-O) (598.0 ± 11.9) g ($P=0.003$). Hyperinsulinemic-euglycemic clamp test showed that the glucose infusion rate was significantly lowered in aged DM-O (6.23 ± 0.30) mg/(kg·min) than in the CT-O (8.65 ± 0.43) mg/(kg·min) ($P=0.005$). Western blot showed that p-Akt/Akt level in the aged DM-O (0.0234 ± 0.0044) was significantly lowered than that in the CT-O (0.0598 ± 0.0110) ($P=0.016$), and p-Irs/Irs level in the aging DM-O (0.255 ± 0.031) was significantly lower than that in the CT-O (0.452 ± 0.057) ($P=0.016$). Oil red O staining revealed that liver tissues lipidosis was more serious in the aged DM-O than in the CT-O. Liver TG

作者介绍: 章誉尧, Email: jangyuyao@yeah.net,
研究方向: 内分泌与代谢。
通信作者: 肖晓秋, Email: xiaoxq@cqmu.edu.cn。
基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81270947); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (博导类) (编号: 20115503110008)。
优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150709.2110.021.html> (2015-07-09)

content was significantly increased in the aged DM-O (86.2 ± 10.2) mol/g, but was significantly lower than in the CT-O (61.10 ± 4.71) mol/g ($P=0.045$). **Conclusion:** Paternal diabetes mellitus induces insulin resistance in the aged offspring, possibly caused by liver tissues lipidosis.

【Key words】body weight; paternal diabetes; insulin resistance

2010年全球已有糖尿病患者2.85亿,其中亚洲占60%,预计到2030年将达到4.38亿^[1]。糖尿病因其较高发病率和高死亡率,现已成为严重威胁全球人类健康的慢性非传染性疾病之一,并有全球流行的趋势^[2]。2010年我国已有9 240万糖尿病患者,成人发病率为9.7%,同时有1.482亿前期糖尿病人群,占总人口15.5%^[3]。

多种因素与糖尿病的发生有关,比如城市化步伐加快、饮食结构的改变,尤其是西式饮食引起的肥胖;此外,性别、年龄及遗传等因素也与糖尿病发生关系密切^[4]。现有研究表明,母代患糖尿病及妊娠期合并糖尿病可引起子代代谢紊乱,患糖尿病及相关疾病风险增加^[5]。而父代糖尿病对子代的影响目前研究较少,多集中于流行病学调查和临床研究,具体机制尚不明确^[6]。本研究在建立父代糖尿病动物模型的基础上,探讨了父代糖尿病对老年子代胰岛素敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 由重庆医科大学动物中心提供约8周龄健康 Sprague-Dewley (SD) 雄鼠及雌鼠(许可证编号:SCXK(渝)2007-0001),体质量(200 ± 10) g,饲养于 SPF 清洁级动物房。每天恒定光照 12 h,相对湿度 60%,温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。给予充足的饮水和食物。每笼 5 只饲养,每周更换鼠笼。保持环境安静清洁,每周消毒。本研究得到作者所在单位实验动物伦理委员会的审查批准。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(s0130);重组人胰岛素注射液购于礼来苏州制药有限公司(12701055);p-Akt(4060, Ser473)及Total-Akt(4691)兔抗鼠多克隆一抗购于Cell Signaling Technology 公司;p-Irs1(ab66153, Y612)及Total-Irs1(ab131487)兔抗鼠多克隆一抗购于abcam公司;油红O(O9755)购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;甘油三酯(组织细胞)酶法测定试剂盒(E1013)购于北京普利莱基因技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 血糖仪及血糖试纸(卓越金锐)购于德国罗氏诊断有限公司;微量注射泵(SK-500II)购于深科医疗器械技术开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 父代糖尿病模型的建立 领取20只约8周龄健康SD雄鼠。随机分为2组,即糖尿病组(diabetes mellitus, DM)组和对照组(control, CT)组。适应2周后,禁食12 h,DM组大鼠腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 40 mg/kg)^[7],CT组动物腹腔注射溶媒(柠檬酸-枸橼酸钠缓冲溶液);用药后间隔72 h采尾静脉血检测血糖水平,连续测两次。1个月后,挑选血糖水平高于16.7 mmol/L作为父代糖尿病模型,每组各5只。

1.2.2 子代动物分组及处理 DM组与CT组动物分别与健康8周龄SD雌鼠(200 ± 10) g按1:2比例合笼交配。雌鼠分娩后称量幼鼠出生体质量,调整每窝幼鼠数为10只,以避免早期营养状况不均对子鼠生长发育造成影响。断奶后从每组总子鼠中随机挑选10只雄性为研究对象,2组后代分别记做糖尿病后代(offspring of diabetes mellitus, DM-O)组和正常后代(offspring of control, CT-O)组,正常饲料喂养至老年期(82周龄)。处理动物,收集肝脏组织。

1.2.3 血糖监测 全部实验动物,在正常饲养和禁食12 h条件下,采血针刺破尾尖取外周血,采用罗氏血糖仪及血糖试纸检测分别检测随机血糖和禁食血糖水平,以mmol/L表示。

1.2.4 麻醉状态下高胰岛素正常血糖钳夹实验 2组动物在81周时进行麻醉状态下的高胰岛素正常葡萄糖钳夹实验,参考李晨钟等^[8]人方法。动物称重后,测起始血糖;麻醉动物,进行颈动脉和颈外静脉插管,管内用50 U/ml肝素充满;手术后静置2 h消除应激反应,后输入胰岛素[4 mU/(kg·min)流速0.2 ml/h],5 min为一个时间点调节葡萄糖输注率[mg/(kg·min)],至血糖值介于起始血糖正负0.5之间,并且平稳0.5 h以上时,记录为稳定葡萄糖输注率。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot) 采用赛默飞(ThermoScientific)蛋白裂解液提取肝组织总蛋白,碧云天BCA试剂盒检测蛋白浓度,SDS-PAGE方法分离目的蛋白,其中分离胶浓度10%,浓缩胶为5%,PVDF转膜。ECL试剂盒(Bio-Rad公司)进行化学发光。所得数据用FUSION软件进行定量分析,以目的基因与 β -actin条带灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

1.2.6 油红O染色 称量油红O 0.5 g溶于异丙醇100 ml,配制饱和油红O染液备用。取油红饱和液12 ml,加蒸馏水

8 ml, 静置 5~10 min 过滤后使用。肝脏冰冻切片 PBS 冲洗后, 置于油红 O 稀释液中染色 20 min, 染色过程避光。60%异丙醇分化 5 s。水洗后苏木精复染核。自来水冲洗 1 min 后以甘油明胶封片。

1.2.7 肝脏甘油三酯(triglyceride, TG) 肝脏TG测量按照北京普利莱基因技术有限公司提供TG(组织细胞)酶法测定试剂盒(E1013)说明书操作。

1.3 统计学分析

所有数据均采用统计软件Graphpad Prism 5处理, 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; Western blot 结果灰度采用FUSION软件分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 父代糖尿病模型

造模前, DM 组与 CT 组相比, 血糖和体质量无差异(图 1A、B); 经腹腔注射 STZ 造模后, DM 组血糖(22.6 ± 1.32) mmol/L 明显高于 CT 组(5.88 ± 0.13) mmol/L(图 1A, $P=0.000$); DM 组体质量(260.0 ± 12.5) g 明显低于 CT 组(351.0 ± 11.5) g(图 1B, $P=0.001$); 但雌鼠在合笼时体质量、血糖无差异(图 1C、D), 避免了母代对子代的影响。

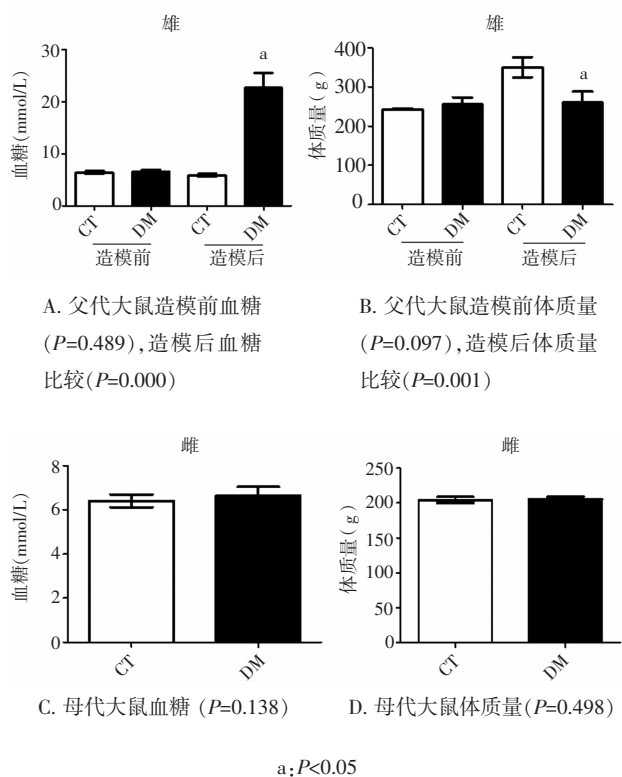


图 1 父代糖尿病模型建立

Fig.1 Paternal diabetes model

2.2 老年子代体质量

父代 DM-O 组 30 周成年时体质量(537.0 ± 17.2) g 明显高于 CT-O 组(480.0 ± 16.1) g(图 2A, $P=0.025$); DM-O 组 70 周老年时体质量(596.0 ± 14.9) g 明显高于 CT-O 组(551.0 ± 9.5) g(图 2B, $P=0.021$); DM-O 组 80 周老年时体质量(652.0 ± 10.7) g 明显高于 CT-O 组(598.0 ± 11.9) g(图 2C, $P=0.003$)。

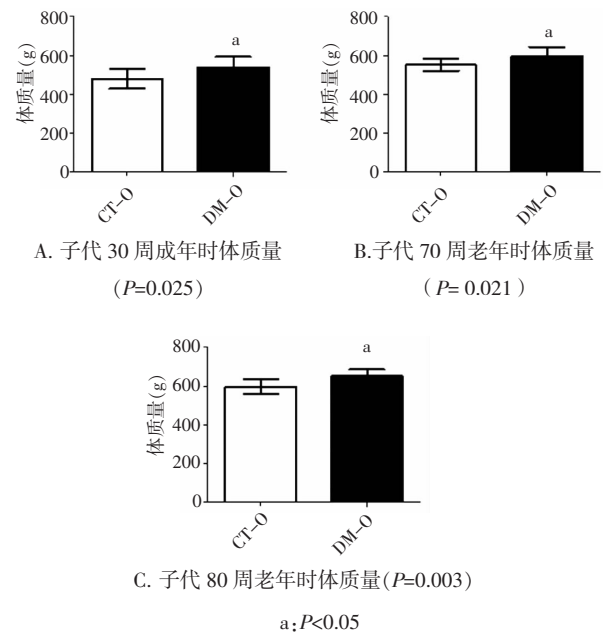


图 2 子代体质量比较

Fig.2 Comparison of body weight in offsprings

2.3 子代随机血糖和空腹血糖

74 周测得 DM-O 组禁食血糖(4.18 ± 0.10) mmol/L 与 CT-O 组(3.97 ± 0.146) mmol/L 相比并无统计学差异(图 3A, $P=0.249$); 78 周测得 DM-O 组随机血糖(7.59 ± 0.28) mmol/L 与 CT-O 组(6.84 ± 0.31) mmol/L 相比并无统计学差异(图 3B, $P=0.091$)。

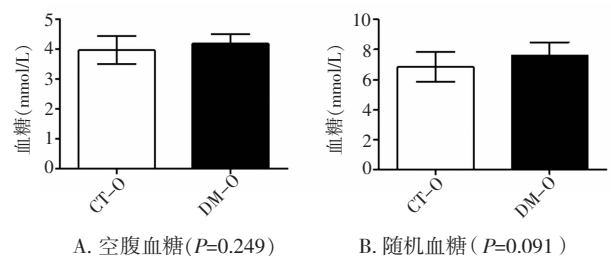


图 3 子代空腹血糖和随机血糖比较

Fig.3 Comparison of fasting blood glucose and random blood glucose in CT-O and DM-O groups

2.4 子代高胰岛素正常血糖钳夹实验

82 周高胰岛素正常血糖钳夹实验结果显示(图 3), DM-

O 组葡萄糖输注率(6.230 ± 0.304) $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 明显低于CT-O 组(8.65 ± 0.43) $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ (图 4, $P=0.005$),表明与 CT-O 组相比 DM-O 组全身胰岛素敏感性降低。

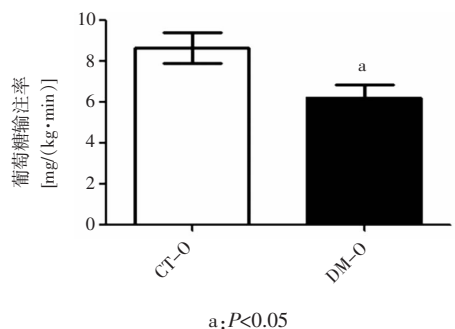


图 4 子代钳夹实验葡萄糖灌注率比较

Fig.4 Comparison of glucose infusion rate in CT-O and DM-O groups

2.5 子代胰岛素信号通路关键因子 Akt 及 Irs-1 磷酸化

Western blot 结果显示肝脏组织 DM-O 组胰岛素信号通路关键分子 Akt 磷酸化(0.0234 ± 0.0044)水平较 CT-O 组(0.0598 ± 0.0110)明显降低(图 5A、B, $P=0.016$);通路信号关键分子 Irs1 磷酸化(0.255 ± 0.031)水平较 CT-O 组(0.452 ± 0.057)亦降低(图 5C、D, $P=0.016$)。

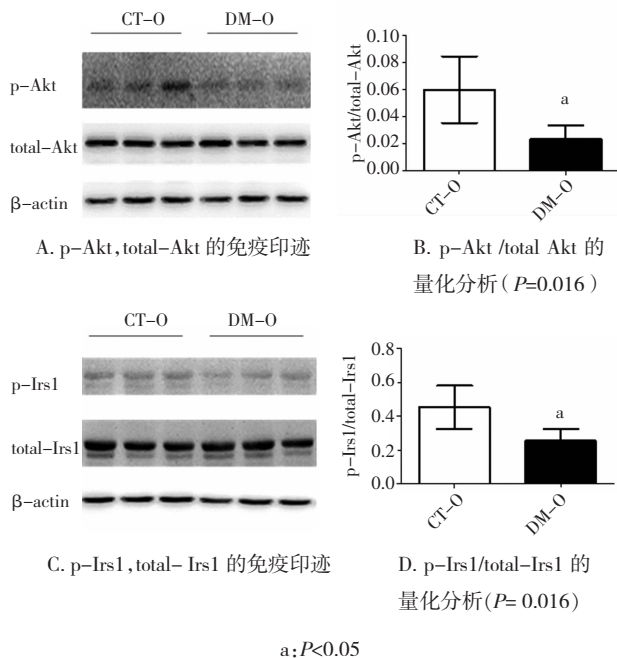


图 5 子代肝脏组织胰岛素信号通路关键蛋白及其磷酸化水平比较
Fig.5 Comparison of insulin pathway signals in the liver of CT-O and DM-O groups

2.6 子代肝脏油红O染色

肝脏组织油红 O 染色观察发现,DM-O 组肝脏脂质沉积较 CT-O 组明显严重,见图 6。

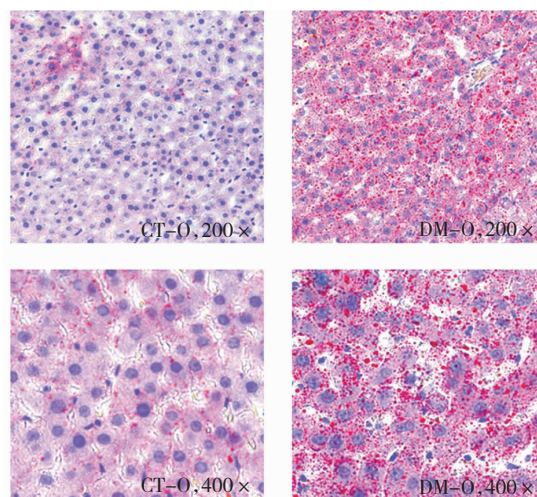


图 6 子代肝脏油红 O 染色比较

Fig.6 Comparison of liver tissues oil red O staining in CT-O and DM-O groups

2.7 子代肝脏 TG 含量

肝脏组织 TG 含量检测显示 DM-O 组(86.2 ± 10.2) mol/g TG 含量较 CT-O 组(60.6 ± 4.10) mol/g 明显升高(图 7, $P=0.046$)。

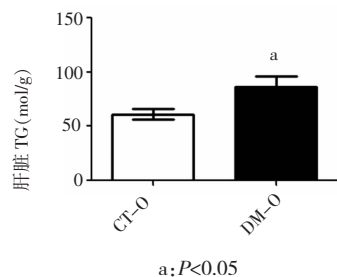


图 7 子代肝脏 TG 含量比较

Fig.7 Comparison of liver TG content in CT-O and DM-O groups

3 讨论

随着社会经济的发展,生活方式的转变,糖尿病已经成为严重威胁人类健康的疾病之一,尤其是在亚太地区^[1]。临床上糖尿病主要分为 1 型(胰岛素依赖型)和 2 型(非胰岛素依赖型),人群中主要以 2 型糖尿病为主。1 型糖尿病是由于子代遗传亲代缺陷基因引起,发病率低,研究和治疗方法较为明确。2 型糖尿病是由多种因素引起的慢性疾病,发病率很高^[1]。在 2 型糖尿病的研究中,亲代对子代的影响一直是热点之一。其中,母代糖尿病及妊娠期糖尿病对子代代谢的影响已有系统和深入的研究;而父亲患糖尿病对子代的影响尚不明确。目前父代患

糖尿病对子代代谢影响的研究多集中于临床调查,其结果显示父代糖尿病可增加子代代谢紊乱的风险,但机制尚不明确^[6]。

2 型糖尿病典型的临床表现是血糖升高,主要原因是胰岛素敏感性降低;高血糖可引起血管和器官的病变,引发多种并发症。STZ 建立糖尿病模型的原理为:STZ 可靶向作用于胰岛 β -细胞,使其产生胰岛素能力下降,进而血糖升高^[9]。这种模型可单因素的研究高血糖对机体的影响,进而明确高血糖对子代的影响。同时,有研究表明 STZ 并不会引起精子的变化而对子代产生影响^[10]。在研究中发现,父代糖尿病可以引起子代体质量增加。体质量增加可引起糖尿病等代谢疾病的发生已经得到公认^[11]。有研究表明体质量增加可能与饮食调控中枢的改变有关^[12]。父代糖尿病引起子代体质量增加是否与进食量及饮食调控中枢改变有关值得进一步研究。

同时,年龄的增长也是糖尿病发生的重要危险因素之一^[13]。2 型糖尿病发生的主要原因是胰岛素敏感性的降低。在监测胰岛素敏感性的实验中,高胰岛素正常血糖钳夹技术的效果优于胰岛素耐量实验^[14]。老年期高胰岛素正常血糖钳夹实验结果显示,糖尿病子代葡萄糖输注率明显低于对照组,表明父代糖尿病可以引起老年子代胰岛素敏感性降低。蛋白激酶 B(Akt)和胰岛素受体底物 1(Irs1)是胰岛素信号通路关键因子,他们的磷酸化有助于胰岛素信号通路激活^[15]。研究中,观察到父代糖尿病子代老年时,Akt 和 Irs1 的磷酸化程度都有降低,表明胰岛素信号通路激活受限。在以往的研究中,我们也观察到父代糖尿病可以引起子代葡萄糖耐量、胰岛素耐量及丙酮酸耐量受损^[16]。肝脏脂质沉积很可能是引起胰岛素抵抗的主要原因^[17]。肝脏组织油红染色和肝脏 TG 含量测定结果显示,父代糖尿病子代肝脏中有大量脂质堆积,肝脏 TG 含量明显升高。

综上所述,父代糖尿病可以导致子代体质量增加、老年时胰岛素敏感性降低、肝脏大量脂质沉积,但子代并未出现明显的高血糖症状,即父代糖尿病增加了患糖尿病的风险。但父代糖尿病对子代以上影响的具体分子机制尚不明确,值得进一步研究阐明。

参 考 文 献

[1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1):

4-14.

[2] Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, et al. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study[J]. Arch Intern Med, 2007, 167(10): 1068-1074.

[3] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.

[4] Anjana RM, Pradeepa R, Deepa M, et al. Prevalence of diabetes and prediabetes (impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance) in urban and rural India: phase I results of the Indian Council of Medical Research-India Diabetes (ICMR-INDIAB) study[J]. Diabetologia, 2011, 54(12): 3022-3027.

[5] Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes[J]. N Engl J Med, 2008, 358(19): 1991-2002.

[6] Tyrrell JS, Yaghootkar H, Freathy RM, et al. Parental diabetes and birthweight in 236 030 individuals in the UK biobank study[J]. Int J Epidemiol, 2013, 42(6): 1714-1723.

[7] Song Y, Li J, Zhao Y, et al. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet[J]. Exp Diabetes Res, 2012(2012): 254976.

[8] 李晨钟, 张素华, 舒昌达, 等. Wistar 大鼠的正常血糖-高血浆胰岛素钳夹技术[J]. 重庆医科大学学报, 1998, 23(2): 149-152.

[9] Rossini AA, Like AA, Chick WL, et al. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(6): 2485-2489.

[10] Wei Y, Yang CR, Wei YP, et al. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(5): 1873-1878.

[11] 朱宇, 霍丽丽, 王芳, 等. 体重与 2 型糖尿病病程的关系[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(3): 166-171.

[12] Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits[J]. Nat Med, 2010, 16(4): 403-405.

[13] Guariguata L, Whiting D, Weil C, et al. The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 94(3): 322-332.

[14] 王晓斌, 池莲祥. 评估胰岛 β 细胞功能及胰岛素敏感性方法[J]. 中国疗养医学, 2010, 19(5): 420-422.

[15] Li Y, Wang J, Gu T, et al. Oleic acid supplement attenuates liquid fructose-induced adipose tissue insulin resistance through the insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 277(2): 155-163.

[16] 彭川, 肖晓秋, 章誉尧, 等. 父代糖尿病对子代糖代谢的长期影响[J]. 四川动物, 2014, 33(3): 358-369.

[17] Laura B, Nicola DG, Alessandro M, et al. Fatal hemorrhagic-necrotizing pancreatitis associated with pancreatic and hepatic lipidosis in an obese Asian palm civet (Paradoxurus hermaphroditus)[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2014, 4(s1): 62-65.

(责任编辑: 唐秋姗)