

二甲双胍改善多囊卵巢综合征大鼠胰岛素敏感性的机制

张二红¹, 黎小妍², 徐 芬³, 张添松⁴, 古 健^{4*}

(中山大学附属第三医院 1. 不育与性医学科, 2. 药剂科, 3. 内分泌与代谢病科, 4. 妇科, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】探讨二甲双胍对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠胰岛素敏感性的作用及机制。【方法】应用脱氢表雄酮制备 PCOS 大鼠模型 20 只,随机分为二甲双胍干预组、PCOS 组各 10 只,同批大鼠设为正常对照组 10 只。干预前后检测大鼠胰岛素抵抗水平,酶法检测肝脏组织甘油三酯含量,Western blot 法检测葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)和磷酸化 AMPKa 蛋白(P-AMPKa)的表达变化。【结果】PCOS 组大鼠表现明显胰岛素抵抗,肝脏组织甘油三酯含量、GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达水平显著高于正常对照组($P < 0.05$)。二甲双胍干预后 PCOS 大鼠胰岛素抵抗明显改善,且其明显抑制了 PCOS 大鼠肝脏甘油三酯含量升高($P < 0.05$)以及 GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达的增高($P < 0.05$),二甲双胍干预后上述指标与正常组无统计学差异。PCOS 组大鼠肝脏 P-AMPKa 蛋白表达显著低于正常对照组($P < 0.05$),二甲双胍治疗后肝脏 P-AMPKa 蛋白表达增至正常对照组水平。【结论】二甲双胍改善 PCOS 大鼠胰岛素抵抗和肝脏脂肪沉积,可能与其激活肝脏组织 AMPK 通路和降低内质网应激水平有关。

关键词: 二甲双胍;PCOS;胰岛素抵抗;肝脏

中图分类号:R711.75

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)06-0839-05

Metformin Improves Insulin Sensitivity of Rat Model with Polycystic Ovary Syndrome and Its Mechanism

ZHANG Er-hong¹, LI Xiao-yan², XU Fen³, ZHANG Tian-song⁴, GU Jian^{4*}

(1. Department of Infertility and Sexual Medicine; 2. Department of Pharmacy; 3. Department of Endocrinology and Metabolism;
4. Department of Gynaecology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of metformin on insulin sensitivity and possible mechanism in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). 【Methods】 PCOS rat model was induced by subcutaneous injecting dehydroepiandrosterone up to 20 days and then divided randomly into PCOS and metformin group. The rats of metformin group were intragastrically given metformin $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 15 days. Blood were collected to test free glucose and insulin levels before and after metformin intervention. Liver tissues were collected to test triglyceride content and protein expression. 【Results】 PCOS rats exhibit insulin resistance and metformin treatment can improve insulin sensitivity in PCOS rats. Triglyceride levels, GRP 78 and SREBP-1c protein expression in the liver of PCOS rats were higher than those of the controls, whereas P-AMPKa protein expression was lower than that of the normal controls ($P < 0.05$). After the treatment of metformin, triglyceride levels, GRP 78 and SREBP-1c protein expression in the liver of PCOS rats were significantly decreased ($P < 0.05$) and P-AMPKa protein expression was increased to the level similar with that of normal controls. 【Conclusion】 Metformin protect PCOS rats against insulin resistance and hepatocytic fat deposition largely through effects on activating AMPK pathway and on decreasing endoplasmic reticulum stress in liver.

Key words: metformin; polycystic ovarian syndrome; insulin resistance; liver

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6):839-843]

收稿日期:2014-06-06

基金项目:广东省科技计划项目(2007B060401018, 2009B030801103);广东省医学科研基金(B2010095);拜耳医药保健有限公司 2011 横向课题

作者简介:张二红,主治医师,研究方向:PCOS 与生殖内分泌,E-mail:sunxilin2014@126.com; * 通信作者:古健,副教授,硕士生导师,研究方向:PCOS 与妇科肿瘤,E-mail:doctorgujian@tom.com

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 临床表现主要以月经异常和生育困难为主, 常伴发 2 型糖尿病、血脂代谢异常等多种疾病, 存在外周组织如骨骼肌、肝脏和脂肪等胰岛素靶器官的胰岛素敏感性下降^[1]。流行病学调查结果显示 PCOS 患者中非酒精性脂肪性肝的发病率明显升高, 非酒精性脂肪肝被视为肝脏组织局部胰岛素抵抗的症状^[2-3]。非酒精性脂肪肝表现为肝脏脂肪沉积、肝细胞损害和肝酶异常等, 在临床实践中 PCOS 患者合并非酒精性脂肪肝的诊断和治疗常被忽视。肝细胞含有丰富的内质网, 内质网是蛋白质合成、折叠和修饰的主要场所, 应激状态下功能紊乱时出现错误折叠与未折叠蛋白聚集以及钙平衡紊乱的内质网应激状态。内质网应激的标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78), XBP-1 等在非酒精性脂肪肝的肝脏组织表达增加, 降低内质网应激水平可以改善肝脏的胰岛素敏感性, 减少异位脂质沉积^[3]。二甲双胍是改善 PCOS 胰岛素抵抗的常用药物, 为 AMP 激活蛋白激酶 (Amp-activated protein Kinase, AMPK) 的激活剂, 增强其活性形式磷酸化 AMPK α 蛋白 (P-AMPK α) 的表达和活性来调节肝糖异生和脂质合成^[4], 二甲双胍对 PCOS 肝脏内质网应激水平影响的研究尚未见报道。本实验旨在观察二甲双胍对 PCOS 大鼠胰岛素敏感性, 特别是肝脏组织胰岛素敏感性的作用并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物模型建立及药物干预

SD 大鼠购自中山大学医学院动物实验中心, 21 日龄断乳, 清洁级饲养, 每日光照 12 h, 并喂以标准大鼠颗粒饲料。适应性喂养 2 d 后, 分为正常组 10 只和建模组 20 只。PCOS 模型组每日颈背部皮下注射脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA, Merck, USA) 0.6 mg/(kg·d) 和 0.2 mL 注射油剂, 正常对照组给予油剂连续 20 d。连续阴道涂片 15d 显示动情周期紊乱提示建模成功, PCOS 大鼠随机分成二甲双胍组和 PCOS 组各 10 只。二甲双胍组大鼠给予二甲双胍 140 mg/(kg·d) 连续灌胃 15 d。干预结束后再次阴道液涂片观察连续

10 d。实验结束后处死大鼠取血, 分离肝脏组织称重后迅速从肝中叶中部取组织 -80 °C 冻存备用。

1.2 观察指标及检查方法

1.2.1 动情周期的观察 大鼠的发情周期为 4~5 d, 不同阶段阴道涂片脱落细胞呈现的细胞类型不同。吸取少量生理盐水, 滴入大鼠阴道, 吹打数次后吸出阴道液, 再吹打均匀后进行涂片, 在显微镜下观察记录细胞类型, 并判断发情周期的阶段^[5]。

1.2.2 体质量和胰岛素敏感性测定 PCOS 建模成功后, 大鼠禁食 12 h 后称重, 采尾静脉血用 Biomine 末梢血糖仪测定血糖 (fasting blood glucose, FPG) 水平。胰岛素 (fasting insulin, FINS) 水平采用 Elisa 试剂盒复孔测定 (Millipore, USA)。采用稳态模型胰岛素抵抗 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) 评估胰岛素抵抗程度, 计算公式如下: $\text{HOMA-IR} = \rho_{\text{FINS}} / (\text{mU/L}) \times \text{CFPG} / (\text{mmol/L}) \div 22.5$ ^[6]。药物干预结束后再次测定以上指标。

1.2.3 肝脏组织甘油三酯 (Triglyceride, TG) 含量测定 取 50 mg 肝脏组织加入 1 mL PBS (Ig: 20 mL) 匀浆, 匀浆后加冰氯仿/甲醇 (体积比 2:1) 混合液 2 mL, 旋涡振荡器充分混匀 2 min, 在通风橱中风干过夜, 再溶解于含 60% 丁醇和 40% Triton-X114/甲醇 (2:1) 的混合液中, 溶解后用酶法 (Serum Triglyceride Determination Kit, TR0100, Sigma, USA) 复孔测定 TG 含量。单位以每 g 肝脏组织中的 TG 含量 (mg/g) 来表示。

1.2.4 肝脏组织相关蛋白表达的测定 用组织裂解液将冻存肝脏裂解匀浆后提取组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取组织蛋白样品 45 μg , 进行 5%、8% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 室温 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 P-AMPK α (CST, USA)、GRP78 (CST, USA)、脂质合成关键因子固醇调节元件结合蛋白-1c (Sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c, CST, USA) 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜, 二抗孵育 1 h 后用 Odyssey 近红外双色激光成像系统显影。Western Blot 实验重复 2 次, 扫描条带灰度后进行统计分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 连续性计量资料采用均数 $\pm$ 标准误表示, 组间比较采用 t

检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结 果

2.1 PCOS 大鼠建模和二甲双胍干预对动情周期的影响

连续阴道液涂片结果显示对照组中的大鼠均出现 4 ~ 5 d 规律的动情周期。本研究采用皮下注射 DHEA 建立 PCOS 大鼠模型, 建模组大鼠出现动情周期紊乱, 失去周期性变化, 提示 PCOS 建模成功。药物干预过程中对照组和二甲双胍组各有一只大鼠不明原因死亡, 其余大鼠生长发育良好。干预结束后阴道液涂片检查发现二甲双胍组中有 7 只大鼠 (77.78%) 恢复规律动情周期, PCOS 组大鼠仍表现动情周期紊乱, 提示二甲双胍可以促进 PCOS 大鼠动情周期规律的恢复。

2.2 二甲双胍干预前各组 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的比较

建模成功后对大鼠的体质量 (body mass, BM) 和胰岛素抵抗水平进行检测 (表 1)。PCOS 建模组大鼠血清 FINS 和 HOMA-IR 水平显著高于正常对照组, 而血清 FPG 及 BM 较对照组无显著性差异。PCOS 建模组随机分为 PCOS 组和二甲双胍组, 以上各检测指标两组相匹配 ($P > 0.05$)。

2.3 二甲双胍改善 PCOS 大鼠胰岛素敏感性, 降低肝脏组织 TG 含量

试验结束后对各组大鼠体质量、血清胰岛素抵抗水平和肝脏组织 TG 含量进行测定, 结果见表 2。二甲双胍干预有明显降低大鼠体质量的趋势, 但差异没有统计学意义。PCOS 组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 和肝脏组织 TG 含量显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)。二甲双胍干预后大鼠血清 FPG、FINS、HOMA-IR 和肝脏组织 TG 含量显著降低, 与 PCOS 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。二甲双胍组大鼠胰岛素抵抗水平和肝脏组织 TG 含量与正常对照组无显著差异。

2.4 二甲双胍对 PCOS 大鼠肝脏组织 P-AMPKa、GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达水平的影响

本研究用 Western blot 方法检测肝脏组织的蛋白表达水平 (图 1A)。进一步对蛋白条带灰度进行统计分析 (图 1B)。与正常对照组比较, PCOS 组肝脏组织 P-AMPKa 蛋白表达降低, GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达水平增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。二甲双胍组干预后肝脏组织 P-AMPKa 蛋白表达增高, GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达水平较 PCOS 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二甲双胍治疗后肝脏组织上述蛋白表达水平与正常对照组无显著性差异。

表 1 DHEA 建模后各组大鼠的 FBG、FINS 及 HOMA-IR
Table 1 Effect of DHEA on insulin sensitivity of rats ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Body mass/g	FPG/(mmol/L)	FINS/(mU/L)	HOMA-IR
Normal Control	10	157.9 ± 4.1	5.14 ± 0.12	9.64 ± 0.73	2.21 ± 0.19
PCOS	10	155.3 ± 4.3	5.51 ± 0.20	16.31 ± 0.78 ¹⁾	3.98 ± 0.20 ¹⁾
Metformin	10	157.0 ± 3.8	5.49 ± 0.16	16.47 ± 1.37 ¹⁾	4.00 ± 0.33 ¹⁾

1) $P < 0.05$ vs normal control group.

表 2 二甲双胍对 PCOS 大鼠胰岛素敏感性和肝脏 TG 含量的影响
Table 2 Effect of metformin on insulin sensitivity and liver triglyceride levels ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Body mass/g	FPG/(mmol/L)	FINS/(mU/L)	HOMA-IR	TG/(mg/g)
Normal control	9	235.3 ± 8.9	5.08 ± 0.08	9.49 ± 0.73	2.15 ± 0.18	0.43 ± 0.06
PCOS	10	239.8 ± 7.8	5.35 ± 0.20 ¹⁾	16.04 ± 0.58 ¹⁾	3.81 ± 0.17 ¹⁾	0.91 ± 0.15 ¹⁾
Metformin	9	217.8 ± 8.3	4.90 ± 0.10 ²⁾	11.49 ± 0.81 ²⁾	2.50 ± 0.18 ²⁾	0.56 ± 0.09 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs normal control group. 2) $P < 0.05$ vs PCOS group.

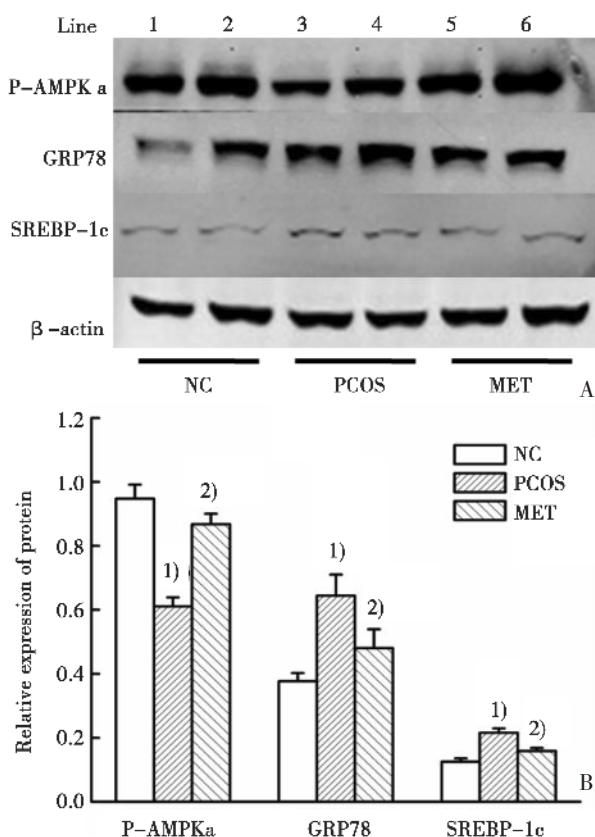


图 1 二甲双胍对 PCOS 大鼠肝脏组织 P-AMPK α , GRP78 和 SREBP-1c 蛋白表达水平的影响

Fig.1 Effects of metformin on protein level of P-AMPK α , GRP78 and SREBP-1c in PCOS livers

A: P-AMPK α , GRP78 and SREBP-1c protein level was measured using Western blot ($n=6$). line 1 and 2, normal control group (NC); line 3 and 4, PCOS group (PCOS); line 5 and 6, metformin group (MET). B: The relative protein expression of P-AMPK α , GRP78 and SREBP-1c to β -actin in livers. 1) $P<0.05$ vs normal control group. 2) $P<0.05$ vs PCOS group.

3 讨论

PCOS 对女性生殖健康和糖脂代谢有负面影响,是生殖内分泌领域的研究热点之一。PCOS 动物模型建立方法有多种,包括雄激素造模法、持续光照造模法、雌激素造模法、来曲唑造模法、胰岛素联合绒毛膜促性腺激素造模法及孕激素联合绒毛膜促性腺激素造模法等。DHEA 诱导 SD 幼年雌性大鼠 PCOS 动物模型的特点是下丘脑-垂体-卵巢轴保持完整,卵巢病理及血内分泌改变与 PCOS 患者有较高的相似性,并存在高胰岛素血症,是目前

较理想的 PCOS 动物模型^[7]。本研究中发现 PCOS 大鼠和正常对照组大鼠相比,虽然体重没有增加,但存在显著胰岛素抵抗和动情周期紊乱,提示 PCOS 大鼠造模成功^[8]。

PCOS 胰岛素抵抗主要发生在肌肉、脂肪和肝脏等外周组织,在肝脏表现为胰岛素抑制肝糖输出能力下降,脂质合成增加。内质网应激在胰岛素抵抗中通过阻碍胰岛素受体后两条信号通路诱导肝脏组织的胰岛素抵抗形成^[9]。内质网应激标志蛋白 GRP78 又称免疫球蛋白结合蛋白,是热休克蛋白 70 家族的成员之一,存在于细胞质内质网膜上。研究发现高脂饮食可诱导肝脏组织 GRP78 表达增强,启动内质网应激,上调脂质合成的关键转录因子 SREBP-1c 蛋白表达,脂质合成增加,与非酒精性脂肪肝的发病密切相关^[10]。AMPK 是调节细胞能量代谢的一种重要的因子,通过 AMPK-mTOR-p70S6K 抑制 SREBP-1c,促进细胞内脂肪酸氧化代谢,抑制脂肪酸和胆固醇合成,调节胰岛素敏感性^[11]。本文研究结果显示 PCOS 组大鼠肝脏组织 P-AMPK α 蛋白表达下降,GRP78 蛋白和 SREBP-1c 蛋白表达以及 TG 含量显著增高,表明 PCOS 大鼠肝脏组织能量代谢下降,内质网应激水平和脂质合成水平增加,脂肪异位沉积增多,与文献报道 PCOS 中非酒精性脂肪肝发病率高的研究结果相符。

二甲双胍可通过改善高雄性激素血症和胰岛素抵抗促进 PCOS 患者月经周期恢复正常及提高排卵率^[8,12]。本研究血清检测结果显示 PCOS 大鼠给予二甲双胍干预后血清 HOMA-IR 水平明显下降,胰岛素敏感性改善,大部分大鼠恢复规律的动情周期,支持二甲双胍对 PCOS 生殖健康的促进作用。文献报道二甲双胍剂量依赖性减轻 PCOS 肥胖患者的体重,改善糖脂代谢异常^[12]。本研究中二甲双胍干预有明显降低 PCOS 大鼠体重的趋势,差异未达到统计学意义($P=0.069$),可能与本研究中 PCOS 大鼠体重相比正常对照组并无明显增加有关,也可能与药物干预剂量和干预时间有关。

研究发现二甲双胍通过激活 AMPK 抑制肝糖异生和脂质合成,改善肝脏脂肪沉积和肝脏胰岛素抵抗^[4,9];还可通过降低脂肪组织和肝细胞的内

质网应激,改善局部组织的胰岛素抵抗^[13-14]。本研究进一步检测肝脏脂质含量和脂质合成相关蛋白,发现二甲双胍增加 PCOS 大鼠肝脏组织能量代谢因子 P-AMPK α 蛋白表达,降低内质网应激标志 GRP78 蛋白和脂质合成因子 SREBP-1c 蛋白的表达,降低肝脏组织 TG 含量,提示二甲双胍治疗不仅增加 PCOS 大鼠肝脏组织能量代谢,而且通过减轻肝脏组织内质网应激来抑制脂质合成,改善 PCOS 大鼠的胰岛素敏感性,为二甲双胍在 PCOS 的治疗作用和机制研究提供了新的证据。

参考文献:

- [1] Haqq L, McFarlane J, Dieberg G, et al. Effect of lifestyle intervention on the reproductive endocrine profile in women with polycystic ovarian syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Endocr Connect*, 2014, 3(1):36-46.
- [2] Setji TL, Holland ND, Sanders LL, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(5): 1741-1747.
- [3] González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 17(5): e1179.
- [4] Zang M, Zuccollo A, Hou X, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(46):47898-47905.
- [5] Zhang S. Vaginal cell changes observed in estrous cycle of rats[J]. *Prog Vet Med*, 2006, 27(2):69-72.
- [6] Abdel-Hakim SM, Ibrahim MY, Ibrahim HM, et al. The effect of ghrelin antagonist (D-Lys3) GHRP-6 on ovariectomy-induced obesity in adult female albino rats [J]. *Endocr Regul*, 2014, 48(3):126-134.
- [7] Zhang XW, Kuang JQ, Zeng AQ, et al. DHEA induced animal model of polycystic ovary syndrome[J]. *Acade J Guangzhou Med Col*, 2000, 28(3):14-17.
- [8] Misugi T1, Ozaki K, El Beltagy K, et al. Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2006, 61(4):208-215.
- [9] Min M, Chen DF, Wang J, et al. Expression and significance of glucose regulated protein GRP78 in nonalcoholic steatohepatitis of rats[J]. *Acta Acade Med Milt Tert*, 2009, 31(1): 79-81.
- [10] Fang DL, Wan Y, Shen W, et al. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1-2):127-137.
- [11] Jo HK, Kim GW, Jeong KJ, et al. Eugenolameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(8): 1341-151.
- [12] Harborne LR, Sattar N, Norman JE, et al. Metformin and weight loss in obese with polycystic ovary syndrome: comparison of doses[J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(8): 4593-4598.
- [13] Pei L, Yang J, Du J, et al. Down regulation of chemerin and alleviation of endoplasmic reticulum stress by metformin in adipose tissue of rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 97(2):267-275.
- [14] Kim DS, Jeong SK, Kim HR, et al. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(2):251-257.

(编辑 徐杰)