

胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏色素上皮衍生因子表达的影响

赵 一, 周银莉, 夏 旋, 毕 艳, 翁建平*
(中山大学附属第三医院内分泌科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨胰岛素治疗改善 2 型糖尿病大鼠肝脏中色素上皮衍生因子(PEDF)的表达及其内在机制。【方法】8 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠高脂喂养联合小剂量链脲佐菌素诱导糖尿病模型(12 只),按随机数字表法分 3 组为:糖尿病模型组(DM, 6 只)、胰岛素治疗组(INS, 6 只);另设正常对照组(N, 6 只)。通过 Western blotting 法检测大鼠肝脏 PEDF、基质金属蛋白酶(MMP2)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的蛋白表达。【结果】胰岛素治疗后降低了糖尿病大鼠空腹血糖及血清甘油三酯的含量,改善糖尿病大鼠肝脏脂质沉积的状态;糖尿病大鼠肝脏中 TNF- α 及 MMP2 的蛋白表达高于正常组($P < 0.05$), PEDF 的蛋白表达低于正常组($P < 0.05$),胰岛素治疗后降低了糖尿病大鼠肝脏 TNF- α 及 MMP2 的表达,上调 PEDF 的表达。【结论】胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 PEDF 的上调作用可能与胰岛素的抗炎作用有关,这也可能是胰岛素改善肝脏脂质沉积的机制之一。

关键词: 胰岛素; 糖尿病; 脂肪肝; 色素上皮衍生因子

中图分类号: R587.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)04-0437-05

Effects of Insulin Therapy on Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Expression in Liver of Diabetic Rats

ZHAO Yi, ZHOU Yin-li, XIA Xuan, BI Yan, WENG Jian-ping*

(Department of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) in liver of diabetic rats treated by insulin and underlying mechanism. 【Methods】 High-fat diet and low dose streptozotocin (STZ) induced diabetic rats, which were randomly divided into 2 groups: diabetic rats ($n=6$), diabetic rats treated with NPH insulin ($n=6$), with 6 normal animals as control. After three-week intervention, protein expressions of PEDF, tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase 2 (MMP2) in liver were measured by Western blotting. 【Results】 Insulin decreased fasting blood glucose, serum triglycerides and liver triglycerides in diabetic rats. Significant lipid deposition was reversed in livers of diabetic rats treated by insulin. Compared to normal rats, untreated diabetic rats had higher TNF- α , MMP2 protein expressions and lower PEDF protein expression. The response to insulin therapy in diabetic rats showed downregulated protein expressions of TNF- α and MMP2, upregulated PEDF in liver. 【Conclusion】 The upregulation of PEDF protein expression by insulin may be responsible for the anti-inflammatory action of insulin, which maybe one of the mechanisms that insulin ameliorates triglycerides deposition in liver.

Key words: insulin; diabetes; liver steatosis; pigment epithelium-derived factor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2011, 32(4): 437-441, 462]

肝脏的胰岛素抵抗是 2 型糖尿病全身胰岛抵抗的重要组成部分。肝脏的脂肪沉积导致了肝脏的胰岛素抵抗,加重肝脂的输出和肝糖异生增加。因

此,降低肝脏脂肪沉积对改善肝脏及全身胰岛素抵抗具有重要意义。色素上皮衍生因子(Pigment Epithelium-Derived Factor, PEDF)是一种 50 ku 的

收稿日期: 2011-03-19

基金项目: 国家 973 课题(2006CB503902); 长江学者和创新团队发展计划(985 工程, IRT0947); 国家自然科学基金(81000324)

作者简介: 赵一, 在读硕士研究生, E-mail: zhaoyi1211@139.com; * 通信作者: 翁建平, 博士生导师, 教授, E-mail: wjiangp@mail.sysu.edu.cn

分泌型糖蛋白,在肝脏、脂肪及内皮组织等高表达,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超基因家族成员,但其缺乏抑制蛋白酶的活性^[1]。近年的研究发现:PEDF 与肥胖、代谢综合征、糖尿病密切相关,提示其参与了机体的代谢调节。研究同时发现:PEDF 在脂肪肝中低表达;PEDF 能促进肝脏脂肪水解,提示肝脏中 PEDF 的表达也对肝脏脂质代谢起到重要的作用^[2-3],升高 PEDF 可能是改善脂肪肝的重要途径。研究发现,炎症因子肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α) 能增强基质金属蛋白酶 2 (matrix metallo proteinase 2, MMP2) 的表达,而 MMP2 对 PEDF 具有水解的作用^[3-4];那么,胰岛素能否通过抗炎作用来改善糖尿病大鼠肝脏中 PEDF 表达进而改善肝脏脂质沉积呢?因此,本研究旨在初步探讨胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 PEDF 表达的影响及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物模型制备与分组

8 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只(南方医科大学实验动物中心提供),体质量 180 ~ 200 g,3 只/笼,环境温度 22℃,湿度 60%。SD 大鼠根据体质量按随机数字表法分组,分为正常饮食组 6 只和高脂饮食组 12 只,分别给予普通饲料(热量比:10%脂肪、64%碳水化合物、26%蛋白质)和高脂饲料(热量比:56%脂肪、32%碳水化合物、14%蛋白质)喂养。高脂饮食组大鼠在高脂喂养 5 周后,隔夜禁食 12 h 后一次性腹腔注射 1%链脲佐菌素(streptozotocin,溶解于 4℃的 pH 4.2 枸橼酸缓冲液, Sigma, USA) 40 mg/kg,3 d 后取尾静脉血测定随机血糖 > 16.7 mmol/L 认为造模成功,并随机分为糖尿病组(DM,腹腔注射生理盐水)、胰岛素治疗组(INS,中性精蛋白胰岛素 N 注射液 6 ~ 8 U/d,皮下注射,血糖控制目标是空腹血糖 < 8.0 mmol/L)。治疗 3 周后,禁食 12 h 后以 0.4 g/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉,抽取腹主动脉血检测相关指标检测,动物行麻醉处死。取肝脏组织经液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱。以上实验均得到中山大学实验动物伦理委员会的批准。

1.2 组织病理检测

动物处死后,取肝脏于 40 g/L 多聚甲醛液固定,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明后,石蜡包埋,连续

切 5 μm 厚度切片后用苏木精/伊红(HE)染色;新鲜肝脏组织的冰冻切片,用 0.5%油红 O 溶液染色。

1.3 空腹血糖、血清甘油三酯和肝脏甘油三酯含量测定

血糖以强生 One Touch SureStep 血糖试纸检测,血清甘油三酯测定采用酶比色法;肝脏甘油三酯测定:取 100 mg 肝脏,加 500 μL 冰盐水匀浆后,加冰氯仿-甲醇(体积比 2:1)混合液,匀浆后室温下孵育 5 h,再加氯仿,离心,弃掉上层液体及组织块,挥干氯仿,剩余的甘油三酯,加氯仿 1 mL 溶解后用 TG 测定试剂盒(北京豪迈生物工程有限公司)测定甘油三酯含量。

1.4 Western blotting 法

检测肝脏组织 PEDF, MMP2, TNF- α 蛋白表达水平:从 -80℃ 冰箱取出大鼠肝脏,取 0.1 g 组织并加入 4℃的 500 μL 组织裂解液裂解,匀浆器冰上匀浆 5 min 后,4℃离心(12 000 $\times g$, 15 min),取上清液,以二喹啉甲酸(BCA)法(上海生工试剂盒)测定总蛋白浓度。通过 10%的 SDS-PAGE 分离蛋白后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h,1 \times TBST 漂洗 3 次每次 10 min,加入一抗 PEDF(1:1 000, Millipore, USA); TNF- α (1:400, Santa Cruz, USA); MMP2(1:200, Santa Cruz, USA); β -actin 抗体(1:1 000, 博士德公司,中国)4℃孵育过夜,次日 1 \times TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000 稀释)室温孵育 1 h,漂洗后在暗室中用增强化学发光检测试剂(ECL)显色,并用 Quantity-One 图像分析软件对 PEDF、MMP2、TNF- α 、 β -actin 条带的光密度比值进行相对定量分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料均采用均数 \pm 标准差表示,多组资料比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结 果

2.1 各组大鼠代谢及生化指标的变化

2 型糖尿病组大鼠表现为明显糖脂代谢紊乱:空腹血糖,血及肝脏甘油三酯含量与正常组相比明显增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。胰岛素治疗 3 周后降低了空腹血糖、血及肝脏甘油三

酯含量,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),但仍高于正常组(图 1)。

2.2 肝脏 HE 染色和油红 O 染色

肝脏 HE 染色显示糖尿病组肝细胞肿大,充满大小不等的脂肪空泡,空泡大而多可将肝细胞核推向一边,胰岛素治疗后,肝细胞内脂肪空泡明显减少;油红 O 染色显示糖尿病组大鼠油红 O 染色(红染部分)较正常组明显增多,胰岛素治疗后

红染部分则明显减少(图 2),提示模型组肝脏脂肪沉积明显,胰岛素能够逆转肝脏脂质沉积。

2.3 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 TNF- α 蛋白表达的影响

与对照组(0.17 ± 0.04)比较,糖尿病大鼠肝脏中 TNF- α 蛋白表达明显升高(0.30 ± 0.10),胰岛素治疗后使 TNF- α 蛋白表达显著下降(0.05 ± 0.03 , $P < 0.05$;图 3)。

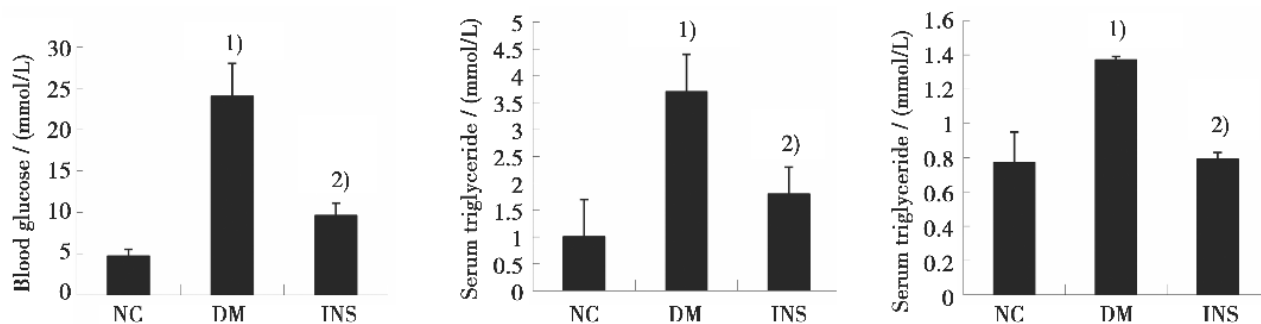


图 1 各组大鼠空腹血糖、血清甘油三酯和肝脏甘油三酯的比较

Fig.1 Comparison of blood glucose, serum triglyceride and liver triglyceride in different group

NC: normal control; DM: diabetic rats with vehicle; INS: diabetic rats treated with insulin; 1) $P < 0.05$ vs. NC, 2) $P < 0.05$ vs. DM. $n = 6$

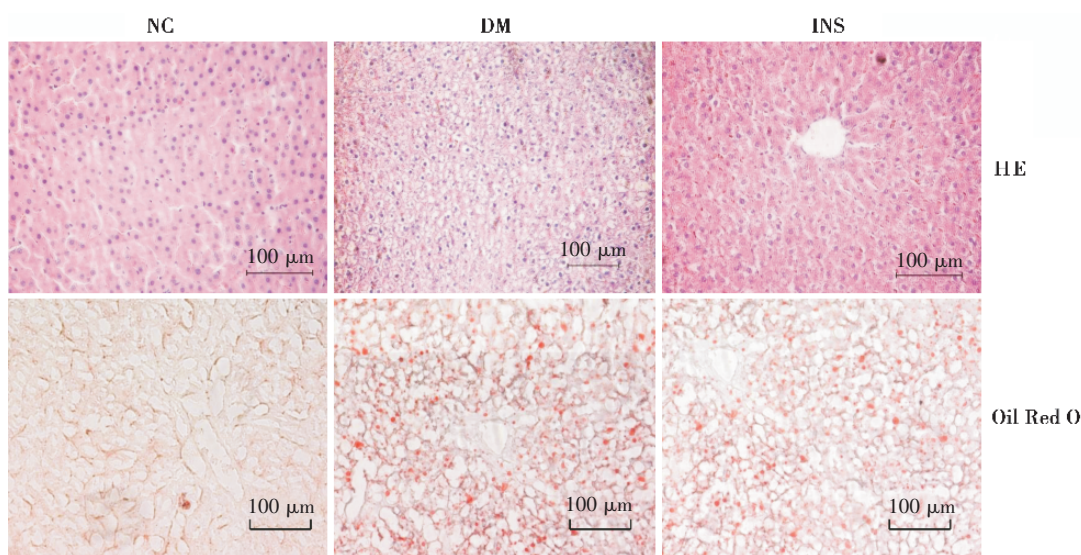


图 2 各组大鼠肝脏脂质沉积的改变

Fig.2 Histology of liver in different group

NC: normal control; DM: diabetic rats with vehicle; INS: diabetic rats treated with insulin; 1) $P < 0.05$ vs. NC, 2) $P < 0.05$ vs. DM

2.4 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 MMP2 蛋白表达的影响

与对照组(0.23 ± 0.03)比较,糖尿病大鼠肝脏中 MMP2 蛋白表达显著上调(0.31 ± 0.05),胰岛素治疗后则显著下调 MMP2 蛋白表达(0.17 ± 0.03 ; $P < 0.05$,图 4)。

2.5 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 PEDF 蛋白水平的影响

与对照组(0.60 ± 0.04)比较,糖尿病大鼠肝脏 PEDF 表达下降(0.36 ± 0.01),胰岛素治疗后使 PEDF 表达上调(0.41 ± 0.01),与未治疗糖尿病组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5),提示胰

胰岛素上调肝脏的 PEDF 表达。

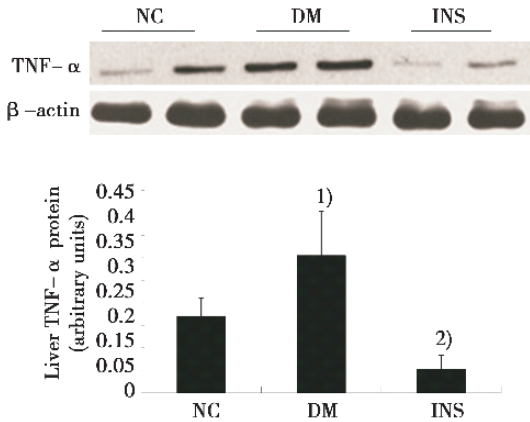


图 3 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 TNF-α 蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of insulin on TNF-α protein level by Western blotting in liver

The upper shows the representative Western blotting; the lower shows the average analysis from three independent experiments. NC:normal control, DM: diabetic rats with vehicle, INS: diabetic rats treated with insulin; 1) $P < 0.05$ vs. NC, 2) $P < 0.05$ vs. DM

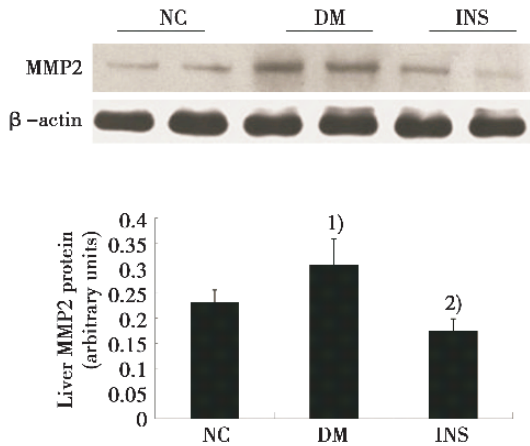


图 4 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 MMP2 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of insulin on MMP2 protein level in Western blotting in liver

The upper shows the representative Western blotting; the lower shows the average analysis from three independent experiments. NC normal control, DM diabetic rats with vehicle, INS: diabetic rats treated with insulin; 1) $P < 0.05$ vs. NC, 2) $P < 0.05$ vs. DM

3 讨论

近 10 年研究发现:糖尿病是一种慢性炎症状

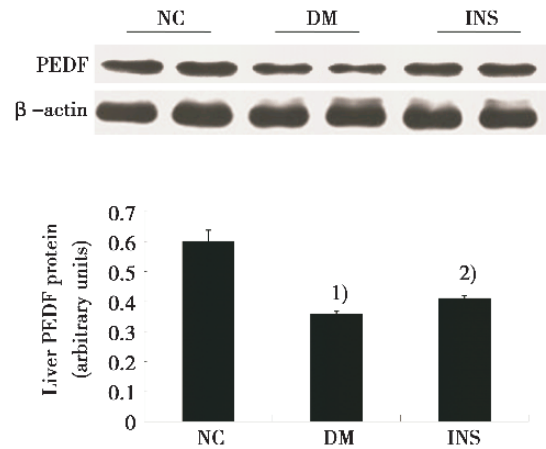


图 5 胰岛素治疗对糖尿病大鼠肝脏 PEDF 蛋白水平的影响 Fig.5 Effects of insulin on PEDF protein level in Western blotting in liver

The upper shows the representative Western blot; the lower shows the average analysis from three independent experiments. NC: normal control, DM: diabetic rats with vehicle, INS: diabetic rats treated with insulin; 1) $P < 0.05$ vs. NC, 2) $P < 0.05$ vs. DM

态疾病。其中,炎症因子的激活与 2 型糖尿病的发生、发展密切相关^[5]。在肥胖的 2 型糖尿病个体中,由于脂肪细胞中脂肪囤积、细胞膨胀,导致脂肪组织血管密度相对降低,脂肪细胞的血供减少,脂肪细胞因缺血缺氧导致大量炎症因子如 TNF-α 释放^[6]。而循环中的炎症因子作用于胰岛素信号通路,加重了代谢靶器官的胰岛素抵抗。当脂肪组织胰岛素抵抗时,脂肪水解增加,脂质外溢,过多的游离脂肪酸进入循环,最终沉积于肝脏、肌肉等异位脂肪沉积器官;另一方面炎症因子,如 TNF-α 也直接作用于肝脏,激活肝脏的炎症通路,阻碍胰岛素信号通路,进一步加重肝脏胰岛素抵抗和肝脏脂质沉积^[7]。

色素上皮衍生因子(PEDF)是 1989 年在胎儿色素上皮细胞的培养基中发现的一种具有营养神经功能的细胞因子^[8],之后研究发现 PEDF 广泛的分布于肝脏、血管内皮、眼、肾脏等器官。1999 年研究又证实 PEDF 是一种强大的血管抑制因子^[9]。近几年的临床研究发现,PEDF 与代谢综合征^[10]及 1、2 型糖尿病存在密切联系^[11-12],并且 PEDF 的水平升高与体质量指数 (BMI)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、血糖、血清胰岛素水平、炎症因子 TNF-α 及其受体 1 呈现显著正相关^[13-14]。基础研究发现,肥胖小鼠血清 PEDF 的表达明显升高,并且引起了肝脏、肌肉等代谢器官的胰岛素抵抗;而用 PEDF 抗

体中和后,能显著改善机体的胰岛素抵抗状态^[15]。但是值得关注的是,与肥胖个体血清中 PEDF 升高至全身胰岛素抵抗相反,肝脏中 PEDF 具有保护作用。研究发现,正常肝脏中 PEDF 呈高表达状态,它能与甘油三酯脂肪酶(ATGL)结合,促进肝脏脂质分解,减少肝脂沉积;在 PEDF 表达减少或缺失的状态下,肝脏呈现过度脂质沉积的表现^[2],因此,PEDF 又被认为是一种肝脏脂质调节因子。在人和动物的酒精性脂肪肝中也发现 PEDF 较正常组表达明显减少,并且认为酒精性脂肪肝中 PEDF 的减少与基质金属蛋白酶 2/9(MMP2/9)增强有关,MMP2/9 通过水解作用,减少 PEDF 的表达^[3]。

研究认为胰岛素具有一定抗炎的作用:一方面,胰岛素通过改善糖脂毒性作用抑制炎症因子的产生^[16-17];另一方面,胰岛素通过抑制 NF- κ B 活性直接抑制炎症因子的产生和释放^[18],另外胰岛素能增强抗炎因子的合成和释放,抑制氧化应激和 ROS 生成^[19]。我们既往的研究提示^[20],该 2 型糖尿病大鼠模型存在明显的炎症状态;经胰岛素治疗后,2 型糖尿病的炎症状态得到逆转,改善了肝脏的胰岛素抵抗及减轻了肝脏的脂质沉积。

本研究发现,2 型糖尿病 SD 大鼠肝脏 PEDF 表达下降,而通过胰岛素治疗上调了糖尿病大鼠肝脏 PEDF 的表达。我们也观察到糖尿病大鼠炎症因子 TNF- α 表达上调的同时 MMP2 的表达也增强;胰岛素治疗后,减轻了糖尿病大鼠的炎症状态,TNF- α 表达下降,MMP2 表达较糖尿病组减低。近期的研究提示^[19]:PEDF 是 MMP2/9 的底物,在缺氧状态和酒精性脂肪肝模型中,MMP2/9 能明显降低 PEDF 的水平,故我们推测:在 2 型糖尿病中,肝脏炎症因子的高表达促进了 MMP2/9 的产生,MMP2/9 又通过水解作用降低了肝脏 PEDF 的表达,最终与 ATGL 作用的 PEDF 减少,导致了肝脏脂质沉积。胰岛素治疗后,通过其抗炎作用改善了炎症状态,抑制了 TNF- α 及 MMP2/9 的产生,使肝脏 PEDF 的水平维持正常,减少了肝脏的脂质沉积。

2 型糖尿病及其所伴随的肝脏脂质沉积、非酒精性脂肪肝、脂肪性肝炎等一系列的病理生理变化,与多个基因调控、多种细胞因子密切相关。本研究试图从炎症的角度及新发现的脂质调节因子 PEDF 入手,探讨炎症促进肝脏脂质沉积的另一机

制。我们的研究发现:细胞因子 PEDF 参与炎症介导肝脏脂质沉积,胰岛素通过抗炎升高糖尿病大鼠肝脏 PEDF 的表达从而改善了肝脏脂质沉积。本实验从炎症方面初步阐释了胰岛素治疗缓解肝脏脂质沉积的内在机制。

参考文献:

- [1] Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, et al. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25992-25999.
- [2] Chung C, Doll JA, Gattu AK, et al. Anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor regulates hepatocyte triglyceride content through adipose triglyceride lipase (ATGL)[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(3): 471-478.
- [3] Chung C, Shugrue C, Nagar A, et al. Ethanol exposure depletes hepatic pigment epithelium-derived factor, a novel lipid regulator[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 331-340.
- [4] Notari L, Miller A, Martinez A, et al. Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(8): 2736-2747.
- [5] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α :direct role in obesity-linked insulin resistance [J]. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91.
- [6] Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2009, 33(1): 54-66.
- [7] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(16): 1221-1231.
- [8] Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30(8): 1700-1707.
- [9] Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor:a potent inhibitor of angiogenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 245-248.
- [10] Yamagishi S, Adachi H, Abe A, et al. Elevated serum levels of pigment epithelium-derived factor in the metabolic syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(6): 2447-2450.
- [11] Jenkins AJ, Zhang SX, Rowley KG, et al. Increased