

过氧钒烟酸对糖尿病鼠磷酸烯醇型 丙酮酸羧化酶的影响^①

王艳林^② 余斌杰 袁敏生 张怡坚 肖亦斌

(中山医科大学附属第一医院内分泌科;广州, 510080)

摘要 用分光光度酶偶联速率法,测定用过氧钒烟酸络合物(POV)和二甲双胍(MET)治疗前后糖尿病鼠肝细胞质的磷酸烯醇型丙酮酸羧化酶(PEPCK)活性。结果显示:糖尿病鼠肝细胞质的PEPCK活性较正常鼠明显增加($P < 0.01$);POV治疗组经POV治疗后该酶活性明显受抑制($P < 0.01$),而MET治疗组经MET治疗后该酶活性虽有轻微降低但无统计学意义。POV和MET对正常大鼠的PEPCK均无明显影响。此结果为POV降低高血糖的分子生化机理提供理论依据,亦为探讨治疗糖尿病新的降糖药提供实验基础。

主题词 钒酸盐类;糖尿病;酶学;丙酮酸羧化酶;酶抑制

中图分类号 R 58; Q5

磷酸烯醇型丙酮酸羧化酶(PEPCK, EC_{4.1.1.49})是肝糖元异生的一个限速酶,在催化丙酮酸、成糖氨酸和三羧酸循环的中间产物变成磷酸烯醇型丙酮酸,最后异生为糖的生化过程中起重要作用。它受许多激素调节,胰岛素可降低PEPCK的活性。糖尿病时此酶活性明显增高使糖异生加速,血糖升高^[1]。业已证明钒具有拟胰岛素样作用,能较快速和持久的降低高血糖,但其确切的分子生化机理不详。本文参考Noce²提出的方法稍加修改,测定糖尿病鼠用POV治疗前后肝细胞质PEPCK活性,旨在探明POV降血糖的分子生化机理,为探索新的降血糖药提供依据。

1 材料和方法

1.1 糖尿病鼠模型的建立与处理

选用雌性SD大鼠,(220~250g),根据本室方法建立糖尿病鼠模型^[3]。选用糖尿病鼠24只和与之配对正常大鼠24只,随机分为6组即糖尿病鼠POV、MET治疗组和对照组正常鼠POV、MET治疗组和对照组。药物均用蒸馏水溶解,POV剂量为 $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,MET剂量为 $600\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 分为3次灌胃,对照组灌入等量蒸馏水,治疗4周。

观察饮水量、体重、血和尿糖水平(每周尾部取血1次)。第5周时处死动物,心内取血2mL,剪下肝脏置 -20°C 保存备用。POV由我室合成^[4],经红外光谱、质谱鉴定其结构为 $\text{K}_2\text{Ni}(\text{H}[\text{VO}(\text{O}_2)_2]_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 。MET为深圳中联制药厂出品。

1.2 样品处理

大鼠肝组织12g剪碎加冷冻过的3mmol/L Tris-HCl缓冲液(含0.15mol/L KCl, pH7.2)10mL,用组织匀浆器捣碎肝组织,冷冻离心 $3\ 500\text{g} \times 15\text{min}$,沉渣上清液用超声细胞破碎机破碎细胞,低温离心 $3\ 500\text{g} \times 15\text{min}$,水相用滤纸去除脂肪,超速冷冻离心 $90\ 000\text{g} \times 30\text{min}$,去沉淀水相分成每管0.5mL,置 -20°C 贮存,并测定各管蛋白浓度。

1.3 酶活性测定

1.3.1 原理

草酰乙酸 $\xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{PEPCK 肌苷或 ITP}}$ 磷酸烯醇型丙酮酸 + CO_2

磷酸烯醇型丙酮酸 + $\text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}}$ 丙酮酸 + $\text{ATP} + \text{CO}_2$

丙酮酸 + $\text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}}$ 乳酸 + NAD^+

测定波长340nm, NADH的摩尔吸光度为6300,测定反应体系中NADH消耗速率。

1.3.2 试剂配制 (试剂购自美国Sigma公司)

40mmol/L三乙醇胺(TEA)缓冲液, pH7.6, 取80%

① 广东省自然科学基金及博士后基金资助项目; ② 第一作者, 1964年出生, 女, 博士后, 副研究员

TEA 3.4 mL加蒸馏水约 400 mL用 1 mol HCl调 pH至 7.6,再加水至 500 mL 基质缓冲液:以 40 mmol TEA缓冲液 90 mL加 KCl 648 mg, Mg-SO₄ 247 mg, EDTA Na₂ 156 mg, ADP Na₂ 110 mg, β-NADH 23 mg调 pH至 7.6,再加入丙酮酸激酶 (PK) 100 μl (200U), 乳酸脱氢酶 (LDH) 40 μl (384'), 肌苷 100 μl (5 mg),再加 40 mmol TEA至 100 mL,置棕色瓶贮存于 4℃可用 2周。1.5 mmol/L草酰乙酸 (OAA):准确称取 OAA 1.98 mg加水至 10 mL

1.4 测定方法

烯醇型丙酮羧化酶测定方法见表 1

表 1 烯醇型丙酮羧化酶测定操作程序

	测定管	空白管
样品液	100 μL	
蒸馏水		100 μL
基质缓冲液	1000 μL	1000 μL
混匀 28℃水浴孵育 5 min		
1.5 mmol/L OAA	100 μL	100 μL
充分混匀		

烯醇型丙酮羧化酶测定按表 1操作程序进行,充分混匀后立即测定。选定 340 nm 光波,以空白管调零,分别读取测定管 0 min 和 5 min 的吸光度。用 5 min 的吸光度减 0 min 时的吸光度 (A),按以下公式算出每公升活性单位 (U)。然后根据测定管蛋白量计算每 100 mg 蛋白含单位量 (单位以 U · 100 mg 蛋白⁻¹ · L 表示)。

$$U/L = \frac{A \times 10^6}{6.300 \times 1.2/0.1}$$

1.5 统计学处理

以每 100 mg 肝细胞质蛋白中所含酶活性单位计算均数及标准差,并进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 疗效观察

各组大鼠用 STZ 处理后约于 4 周左右形成稳定的糖尿病模型,空腹血清胰岛素水平明显下降 (糖尿病鼠为 8.3 mIU/L ± 1.6 mIU/L, 正常鼠为 19.3 mIU/L ± 2.3 mIU/L, P < 0.01)。糖尿病鼠 (A 组)用 POV 治疗后自 2 周开始空腹血糖下降,4 周后血糖较原水平下降了 70% (由 24.7 mmol/L ± 2.

2 mmol/L → 8.0 mmol/L ± 2.8 mmol/L, P < 0.01), 体重净增 10 g ± 1.2 g, 饮水量减少 59% (215 mL ± 10 mL, d/只 → 90 mL ± 10 mL, d/只), 进食量减少 50% (140 g ± 9 g, d/只 → 70 g ± 8 g, d/只, P < 0.01), 未见明显副作用,血 ALT AST BUN 肌酐、钙、磷等均正常。糖尿病鼠 (C 组)用 MET 治疗后血糖虽有轻微降低 (25.7 mmol/L ± 1.2 mmol/L → 22.5 mmol/L ± 2.3 mmol/L), 但无统计学意义,有个别大鼠出现腹泻。正常鼠经上述处理后血糖无明显变化。

2.2 POV 对糖尿病鼠 PEPCK 酶活性的影响

表 2 POV 糖尿病鼠 PEPCK 酶活性的影响 (x̄ ± s)

组别	n	PEPCK (U · 100 mg 蛋白质 ⁻¹ / L)
A 糖尿病鼠+ POV	8	27.0 ± 5.0
B 糖尿病鼠对照	8	67.4 ± 5.3
C 糖尿病鼠+ MET	8	48.8 ± 1.7
D 正常鼠+ POV	8	42.2 ± 2.5
E 正常鼠+ MET	8	48.2 ± 2.9
F 正常鼠对照	8	48.4 ± 4.3

注: A B 两组之间及 A B 两组与其他各组之间比较,均有统计学差异 (P < 0.01)

结果如表 2 糖尿病鼠对照组 (B), 肝细胞质 PEPCK 活性明显增高,与其它各组之间有显著性差异。糖尿病鼠 (A)用 POV 治疗后, PEPCK 酶活性明显降低,与其它各组之间亦有显著性差异,甚至低于正常对照鼠说明 POV 对 PEPCK 的抑制作用很强。正常鼠用 POV 后亦有所下降,但无统计学意义,糖尿病鼠 (C),用 MET 治疗后此酶活性亦有所下降,与糖尿病未治疗组相比有差异,但不如 POV 治疗组明显。正常鼠对 PEPCK 酶活性均无明显影响。

3 讨论

近年已发现钒具有降血糖作用,但亦具有一定的毒性^[5],主要为生殖毒性,在长期大剂量注射后表现为胎鼠骨骼畸形,大剂量口服可出现胃肠道症状。目前还未发现其有致癌及对心、肝、肾损害的报道。我院内分泌研究室合成的 POV 能增强钒的降糖作用,并减少其毒副作用。业已证明钒降血糖的机理主

要为拟胰岛素样作用,涉及到胰岛素受体和受体后一系列生化过程^[6]。本文观察了 POV 和 MET 对糖尿病鼠的降糖作用和对肝细胞质中肝糖异生限速酶 PEPCK 活性的影响。结果显示:糖尿病鼠用 POV 后,血糖降至接近正常范围,临床症状明显改善,其作用明显优于 MET 且未见副作用。糖尿病肝细胞 PEPCK 活性明显增高,用 POV 治疗后活性受抑制,其作用明显强于 MET。国外有作者对钒酸钠和胰岛素的作用时间作过比较,发现钒具有明显的拟胰岛素样作用,两者强度上接近,但钒的作用比胰岛素长而持久。本文的结果显示: POV 降糖作用的分子生化机理之一是通过抑制肝糖异生速酶 PEPCK 的活性,减少糖异生而降低高血糖。

参 考 文 献

1 Beale EG. Rat hepatic cytosolic phosphoenol pyruvate

carboxykinase(GTP), J Biochem, 1985, 260(19) : 10748

2 Noce PS. Decarboxylation of oxalacetate to pyruvate by purified avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. J Biochem, 1975, 250(23) : 9099

3 朱 丹,余斌杰,秦婉文,等. 立体计量法对链脲佐菌素糖尿病大鼠肾小球毛细血管基底膜和系膜基质改变观察初探. 中山医科大学学报, 1990, 11(3) : 38

4 Djordjevic C, Puryear BC. Preparation, spectroscopic properties, and characterization of novel peroxo complexes of vanadium(V) and molybdenum(VI) with nicotinic acid N-oxide. Inorg Chem, 1988, 27 : 2926

5 杨 森,王燕云. 人体微量元素钒的功能及毒性研究现状,青海医学院学报, 1991, 1 : 104

6 钱玉宁,钱荣立. 钒酸钠对糖代谢的作用(综述). 中华内分泌代谢杂志, 1991, 7(2) : 104

(1996-04-05收稿 1996-10-22修回)

EFFECTS OF PEROXOVANADATE-NICOTINIC ACID ON PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE ACTIVITY IN DIABETIC RATS

Wang Yanlin Yu Binje Yuan Minsheng Zhang Yijian Xiao Yibin

(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity of rat with diabetes treated by peroxovanadate-nicotinic acid (POV) and metformin was determined by spectrophotometrically enzyme-coupling rate method. The results show liver PEPCK activity of diabetic rats was increased significantly, compared with that of normal rats ($P < 0.01$). The rats' PEPCK activity was inhibited obviously after treated with POV for 4 weeks. The enzymatic activity of the diabetic rats treated with metformin was unobviously affected on PEPCK activity of normal rats. The results provided theoretic basis for the molecular biochemical mechanism of POV lowering hyperglycemia, and provided experimental base for exploring a new lowering-hyperglycemia drug.

Subject headings vanadate; diabetes mellitus /enzymology; pyruvate carboxylase; enzyme expression