

胰岛素对糖尿病大鼠肝细胞氧化损伤的影响^{*}

邵 兰^① 李清焕^① 黄 晴^② 刘树森^①

(^①中国科学院动物研究所 北京 100080; ^②沈阳卫生防疫站 沈阳 110031)

摘要: 利用四氧嘧啶建立糖尿病大鼠模型,研究了胰岛素对糖尿病大鼠肝细胞及线粒体氧化损伤的保护作用。结果表明,胰岛素 1 U/kg 皮下注射 9 d,能明显降低肝组织谷丙转氨酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶的活性,显著提高肝组织丙二醛的含量及肝线粒体 O_2^- (活性氧自由基)的生成量,显著提高抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性,提高肝线粒体 H^+ -ATPase 的合成活力,从而使受损的肝细胞功能得到改善。

关键词: 胰岛素;糖尿病;肝功能;氧化损伤;线粒体

中图分类号: Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)05-28-04

Effect of Insulin on Oxidative Damage in Liver of Diabetic Rats

SHAO Lan^① LI Qing-Huan^① HUANG Qing^② LIU Shu-Sen^①

(^① Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Beijing 100080;

^② Health and Anti-Epidemic Center of Shenyang City Shenyang 110031, China)

Abstract: To observe the effects of insulin on liver and liver mitochondria function in Diabetic rats. Rats were injected iv with alloxan 40 mg/kg to induce diabetes. Insulin 1 U/kg sc daily for 9 days can reduce the activity of GPT, GOT, LDH, XOD, decrease the amount of MDA and improve the activity of liver GSH-Px, SOD in liver tissue obviously and remarkably reduce the production of O_2^- , improve the synthesis activity of H^+ -ATPase in liver mitochondria of diabetes rats. So Insulin can prevent the injury from superoxide anion in liver and improve the liver function in liver mitochondria of diabetes rats.

Key words: Insulin; Diabetes mellitus; Liver function; Oxidative damage; Mitochondria

胰岛素是由胰腺中胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白质激素,是目前治疗糖尿病的最重要的药物。胰岛素首先要与特异性受体结合才能发挥其生物效应。肝脏是高等动物体内进行糖、蛋白质、脂肪等物质代谢的重要器官。肝脏功能的正常运行,是机体新陈代谢正常进行的保障。肝脏的损伤、病变必将引起机体的一系列病变。肝细胞膜上存在大量胰岛素特异性受体,因此也是胰岛素作用的主要靶器官^[1,2]。

在糖尿病情况下,由于体内胰岛素绝对或

相对不足,肝细胞得不到胰岛素的滋养,导致肝脏正常功能的损害,而且代谢紊乱产生的有害物质积聚反过来进一步伤及肝细胞,包括造成严重的氧化应激损伤^[3]。因此探讨胰岛素对糖尿病大鼠肝细胞的保护作用,对于深入研究胰岛素治疗糖尿病性肝病的作用机制,发掘胰岛

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770166);

第一作者介绍 邵兰,女,28岁,博士;研究方向:细胞生物学。

收稿日期:2002-01-24,修回日期:2002-06-10

素新的治疗作用都是重要的。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 四氧嘧啶 (Alloxan): Sigma 公司产品, 临用前配制成浓度为 40 mg/ml 的溶液。胰岛素: 上海生物化学制药厂产品。谷丙转氨酶 (GPT) 试剂盒、谷草转氨酶 (GOT) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒均购自北京中生生物工程公司。丙二醛 (MDA) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物 (GSH-Px) 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、黄嘌呤氧化酶 (XOD) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒均购自南京健安生物工程公司。MCLA: Sigma 公司产品。

1.2 仪器 Teflon 电动匀浆器: Braun 公司, USA。可见分光光度计: Vital Scientific 公司, USA。LKB-125 发光仪: LKB, USA。YSI 测氧仪: YSI, USA。

1.3 实验动物及模型 SD 大鼠, 雄性, 体重为 (220 ± 10) g, 中科院动物所实验动物中心提供 (二级, 合格证号 006), 随机分为正常组、糖尿病组、胰岛素组。饥饿 24 h 后, 除正常组外, 其余组尾静脉注射 Alloxan 溶液, 按 40 mg/kg 体重给药, 饲养 10 周后, 测定其血糖浓度, 血红蛋白糖化程度, 筛选出长期维持高血糖水平的大鼠模型。注射胰岛素组 (s.c 胰岛素 1 U/kg 连续 9 d), 正常组、糖尿病组 (s.c 等剂量生理盐水)。

1.4 实验方法

1.4.1 肝匀浆制备 将实验动物断头处死, 迅

速取出肝脏清洗血污取一小块肝, 吸干血水, 称重, 用生理盐水分别制备 10%, 1% 的肝组织匀浆, 按试剂盒所述方法, 测定 GPT、GOT、LDH、MDA、GSH-Px、CAT、XOD、SOD 的活性或含量。

1.4.2 线粒体活性氧自由基 O_2^- 生成状况的测定 大鼠断头处死取出肝脏, 用介质冲洗, 制备匀浆, 600 g、10 000 g 反复离心, 制备肝细胞线粒体^[4]。采用如下化学发光法测定^[5], 反应介质为 300 mmol/L Sucrose, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KH_2PO_4 , 10 mmol/L KCl, 0.05 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L MCLA, 4 mmol/L Rotenone, pH 7.5, 加入线粒体浓度为 0.1 mg/ml。25℃ 恒温。加入 3.3 mmol/L Succinate 启动反应, 在发光仪上测试, 计算 O_2^- (活性氧自由基) 生成量。

1.4.3 线粒体 H^+ -ATP 酶合成活力测定^[6] 用荧光素-荧光素酶的方法, 反应介质 1 ml, 加入荧光素酶 1.5 μ l, 在 25℃ 恒温下, 用 50 μ mol/L ADP 启动反应记录基线本底值, 加入线粒体蛋白浓度为 0.1 mg/ml, 直至反应曲线达到峰值并平稳, 记录峰值, 计算线粒体 H^+ -ATP 酶合成活力。

2 结 果

2.1 胰岛素对糖尿病大鼠肝功能生化指标的影响 胰岛素对 Alloxan 所致糖尿病大鼠肝组织 LDH 活性的升高, 有非常明显的降低作用 ($P < 0.01$)。对 GOT、GPT 活性的升高, 也有明显降低作用 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 胰岛素治疗后各组实验大鼠肝功能生化指标的比较 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	LDH/ (U/L)	GOT/ (U/L)	GPT/ (U/L)
正常组	-	8	324.6 ± 107.3	82.3 ± 11.7	50.1 ± 9.8
糖尿病组	-	8	752.4 ± 143.3 ^{△△}	143.4 ± 29.5 [△]	99.2 ± 23.3 [△]
胰岛素组	1	8	398.7 ± 103.6 ^{**}	90.5 ± 10.2 [*]	54.4 ± 16.7 [*]

与正常组比较 $\triangle\triangle P < 0.01$, $\triangle P < 0.05$; 与糖尿病组比较 $** P < 0.01$, $* P < 0.05$

2.2 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 T-SOD、CAT、GSH-Px 活性的影响 胰岛素对 Alloxan 所致糖尿病大鼠肝组织抗氧化酶 T-SOD、GSH-Px 活性

的降低有显著升高作用 ($P < 0.01$), 对 CAT 则无明显影响 ($P > 0.05$) (表 2)。

表2 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 T-SOD、CAT、GSH-Px 活性的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	T-SOD/ (U/L)	CAT/ (U/mg·pro)	GSH-Px (IU)
正常组	-	8	39.82 ± 6.13	24.75 ± 4.51	90.30 ± 10.81
糖尿病组	-	8	13.54 ± 7.92 ^{△△}	24.97 ± 4.79	54.81 ± 15.35 [△]
胰岛素组	1	8	34.44 ± 11.86 ^{**}	26.77 ± 6.45	87.68 ± 13.67 ^{**}

与正常组比较^{△△} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$; 与糖尿病组比较^{**} $P < 0.01$

2.3 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 XOD 酶活性、MDA 含量的影响 胰岛素对 Alloxan 所致糖尿病大鼠肝组织自由基产物 MDA 含量的增加及促自由基生成酶 XOD 活性的升高具有明显降低作用($P < 0.05$)(表3)。

表3 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 XOD 酶活性、MDA 含量的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	MDA (nmol/ml)	XOD (U/g·pro)
正常组	-	8	4.86 ± 1.02	3.63 ± 0.84
糖尿病组	-	8	7.45 ± 1.35 [△]	5.27 ± 1.61 [△]
胰岛素组	1	8	5.33 ± 0.36 [*]	3.68 ± 0.63 [*]

与正常组比较[△] $P < 0.05$; 与糖尿病组比较^{*} $P < 0.05$

2.4 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏线粒体 O_2^- 生成量、 H^+ -ATPase 合成活力的影响 胰岛素对 Alloxan 所致糖尿病大鼠肝细胞线粒体 O_2^- 生成量的升高具有明显降低作用($P < 0.01$), 对线粒体膜 H^+ -ATPase 合成活力的降低也有显著升高作用($P < 0.05$)(表4)。

表4 胰岛素对糖尿病大鼠肝脏线粒体 O_2^- 生成量、 H^+ -ATPase 合成活力的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (U/kg)	n	O_2^- 生成量 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{pro}$)	H^+ -ATPase 合成活力 ($\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{pro}$)
正常组	-	8	0.75 ± 0.32	77.45 ± 18.61
糖尿病组	-	8	1.43 ± 0.24 ^{△△}	53.55 ± 13.59 [△]
胰岛素组	1	8	0.72 ± 0.24 ^{**}	72.55 ± 11.81 [*]

与正常组比较^{△△} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$; 与糖尿病组比较^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

最近研究表明^[3], 在糖尿病的发展过程中伴随肝组织的氧化损伤, 这种氧化损伤的发生可能与自由基代谢紊乱有关。作者的实验表

明, 长期处于高血糖状态下, 确实能引起大鼠肝脏生化功能的损伤, 表现在与肝脏损伤密切相关的谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性明显升高。而肝脏内主要自由基清除酶谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性明显降低, 同时肝组织 MDA 生成量增多, 与自由基生成密切相关的黄嘌呤氧化酶活性明显升高, 自由基的主要来源地线粒体 O_2^- 生成量的增加也远远超出正常范围, 因此由于肝脏自由基清除能力的减弱及自由基生成量的增加, 肝细胞膜和肝细胞线粒体膜必然受到自由基的损伤^[7, 8], 导致肝功能的损伤。而线粒体膜的损伤又引发呼吸链酶失活, H^+ -ATPase 结构的完整性受到破坏, 合成活力下降, 导致肝损伤的进一步加剧。

注射胰岛素后, 糖尿病大鼠肝组织 GPT、GOT、LDH 的活性明显降低, 说明胰岛素对糖尿病大鼠肝功能的恢复具有一定作用, 同时大鼠肝组织中 GSH-Px、SOD 等抗氧化酶的活性明显升高, 促氧化酶 XOD 的活性明显降低, 而 MDA 含量与糖尿病组比较也明显下降。表明, 胰岛素在有效的抑制肝组织脂质过氧化的发生的同时, 还能通过提高抗氧化酶、抑制促氧化酶的活性来加速自由基的清除, 减少自由基的产生, 从而保护肝脏功能免受氧化损伤。进一步实验结果证明, 胰岛素可通过抑制肝线粒体 O_2^- 的生成, 从根本上抑制自由基链式反应的发生, 保护肝细胞及线粒体的功能。另一方面线粒体 H^+ -ATPase 得到保护后, 合成活力升高, 其氧化磷酸化功能也得到改善^[1], 从而使肝细胞功能得到根本的恢复。

因此, 胰岛素对糖尿病的治疗, 不仅是由于它的降糖作用, 而且与它对肝细胞结构及功能

的保护作用有关。

参 考 文 献

- [1] Kazuo Ozawa. Liver Surgery Approached through the Mitochondria. 1st ed. Tokyo (Japan): Medical Tribune Publishers, 1992.
- [2] Aoki T T, Benbafka M M, Dkimura M C *et al*. Long-term intermittent intravenous insulin therapy and type 1 diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 342: 515 ~ 519.
- [3] Baynes J W, Thorpe S R. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*, 1999, 48: 1 ~ 9.
- [4] 张桦, 焦选茂, 刘树森等. 缺血再灌注对大鼠心肌线粒体电子传递与质子泵出偶联的影响. 中国病理生理杂志, 1993, 9(5): 561 ~ 563.
- [5] Nakanok M. Assay of formation or removal of oxygen radicals. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 255 ~ 263.
- [6] Zhu S J, Wang X M, Jiao X M *et al*. Investigation of synthetic and hydrolytic activities of H⁺-ATPase in myocardial mitochondria with ischemia/ reperfusion injury and protective effect of DS-182. *Chinese Journal of Pathophysiol*, 1995, 11(1): 42 ~ 45.
- [7] Mcord J M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 1985, 312: 159 ~ 163.
- [8] Song W. Effect of glycosylprotein and free radicals on diabetes and its complication. *Chinese Journal of Endocrine*, 1993, 9(3): 170 ~ 172.