

二甲双胍对去卵巢模型大鼠血清中瘦素含量的影响及作用机制

王志新*, 康 白#(潍坊医学院应用药理学实验室, 山东 潍坊 261053)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3102-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.11

摘要 目的:研究二甲双胍(MF)对去卵巢模型大鼠血清中瘦素含量的影响及其机制。方法:取雌性大鼠行卵巢摘除术建立去卵巢模型,随机分为模型组和MF低、高剂量[135、270 mg/(kg·d)]组,每组10只,另选健康雌性大鼠10只行假手术作为假手术组。模型组和假手术组大鼠灌胃0.9%氯化钠溶液5 ml/(kg·d),MF低、高剂量组大鼠灌胃相应药物,连续给药42 d。放射免疫法测定各组大鼠血清中瘦素含量并称体质量,逆转录-聚合酶链式反应技术检测各组大鼠脂肪中细胞因子信号传导抑制因子3(SOCS-3)mRNA的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中瘦素含量、体质量和脂肪内SOCS-3 mRNA表达均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,MF高剂量组大鼠血清中瘦素含量、体质量和脂肪内SOCS-3 mRNA表达均明显降低($P<0.05$),MF低剂量组大鼠上述指标差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:高剂量MF可明显降低去卵巢模型大鼠血清中瘦素含量,其机制可能与显著下调脂肪内SOCS-3 mRNA表达有关。

关键词 二甲双胍;去卵巢;大鼠;瘦素;细胞因子信号传导抑制因子3

Effects of Metformin on the Serum Content of Leptin in Ovariectomized Model Rats and Its Mechanism

WANG Zhi-xin, KANG Bai (Lab of Applied Pharmacology, Weifang Medical College, Shandong Weifang 261053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of metformin (MF) on the serum content of leptin in ovariectomized model rats and its mechanism. METHODS: Female rats underwent ovariectomy surgery to establish ovariectomized model. Model rats were randomly divided into model group, MF low-dose and high-dose groups [135, 270 mg/(kg·d)] with 10 rats in each group; other 10 healthy female rats underwent sham operation were sham group. Model group and sham group were given 0.9% Sodium chloride 5 ml/(kg·d) intragastrically, and MF low-dose and high-dose groups were given relevant drugs intragastrically for consecutive 42 days. The serum content of leptin was measured with radioimmunoassay and body weight of rats were measured; the expression of SOCS-3 mRNA in lipid was measured with RT-PCR. RESULTS: Compared with sham group, the serum levels of leptin, body weight and the expression of adipose SOCS-3 mRNA increased significantly in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the serum levels of leptin, body weight and the expression of adipose SOCS-3 mRNA decreased significantly in MF high-dose group ($P<0.05$); but above index had no statistical significance in MF low-dose group ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The high-dose of MF can significantly decrease the serum levels of leptin in ovariectomized model rats, and it may be related to the down-regulation of the expression of SOCS-3 mRNA.

KEY WORDS Metformin; Ovariectomized; Rats; Leptin; Suppressor of cytokine signaling 3

随着生活水平的提高,肥胖已成为严重威胁公共社会健康的问题。目前普遍认为,肥胖者体内存在瘦素抵抗现象,而细胞因子信号传导抑制因子3(Suppressor of cytokine signaling 3, SOCS-3)则可诱导瘦素抵抗的发生^[1-2]。随着年龄的增加,妇女进入更年期,女性荷尔蒙开始减少,绝经后雌激素不再分泌,导致食欲大开,加之新陈代谢速度减缓,造成肥胖,肥胖亦为影响妇女健康的因素之一。二甲双胍(Metformin, MF)为临床常用的口服降糖药,主要用于非胰岛素依赖性糖尿病的治疗,随着对其药理作用的深入研究,发现该药还具有降低体质量指数(BMI)的作用^[3-4]。本文研究了MF对去卵巢模型大鼠血清中瘦素含量的影响及对脂肪中细胞因子信号传导抑制因子3(SOCS-3)mRNA的调节机制,为临床研究MF对更年

期肥胖妇女体内瘦素的抵抗作用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

FT-163G型微型探头 γ 计数器(核工业部北京核仪器厂);梯度聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

MF片(蓬莱诺康药业有限公司,批号:100316,规格:每片0.25 g);雌二醇原料药(潍坊三维生物工程集团有限公司,纯度:99%);瘦素放射免疫试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司);SOCS-3 mRNA提取及逆转录(RT)试剂盒(上海生工生物工程服务有限公司);扩增试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 动物

健康Wister大鼠45只,♀,体质量(200±20)g,由山东鲁抗实验动物中心提供,合格证编号:SCXK(鲁)20080002。

2 方法

* 硕士研究生。研究方向:内分泌药理学。电话:0536-2602250。

E-mail: goodxin@yahoo.cn

通信作者:教授。研究方向:内分泌药理学。E-mail: kb615@163.com

2.1 建模

选用健康♀大鼠45只,其中10只行假手术,另35只均行双侧卵巢摘除手术。大鼠用10%的水合氯醛(350 mg/kg)进行麻醉,腹位固定,在大腿附近沿背部后正中中线作一长为1.0~1.5 cm的纵形切口,分别左右牵拉皮肤切口,钝性分离取出双侧卵巢,行假手术大鼠在卵巢周围取出与卵巢相同大小的脂肪组织。大鼠术后3 d内每日给予5万u的青霉素预防感染。术后第7天,眼球后取血,采用放射免疫法分别测定大鼠血清中雌二醇含量。结果去卵巢大鼠血清中雌二醇含量[(7.56 ± 1.54) ng/ml]明显低于假手术大鼠[(22.68 ± 5.88) ng/ml],表明造模成功,备用。

2.2 分组与给药

选取30只去卵巢模型大鼠,随机分为模型组和MF低、高剂量组,每组10只,另取行假手术的10只大鼠作为假手术组。模型组和假手术组大鼠灌胃给予0.9%氯化钠溶液(生理盐水)5 ml/(kg·d),MF低、高剂量组大鼠分别灌胃MF 135、270 mg/(kg·d),连续给药42 d^[6]。

2.3 血清中瘦素含量与体质量考察

各组大鼠末次给药后,称体质量,禁食12 h,以10%水合氯醛(350 mg/kg)进行麻醉后,由颈总动脉取血约4 ml,室温放置30 min,3 000 r/min离心10 min,分离取上清后,采用放射免疫法分别测定各组大鼠血清中瘦素的含量。

2.4 脂肪中SOCS-3 mRNA表达的检测

各组大鼠取血完毕后迅速取出腹部脂肪组织,放置于液氮中固定,然后转入低温冰箱-80℃保存备用。取各组大鼠脂肪组织约30 mg,加入1 ml Trizol,剪碎匀浆,提取总RNA。当出现RNA沉淀即加入40 ml的无RNA酶的蒸馏水溶解,以紫外-可见分光光度计测定260、280 nm波长处的吸光度(A),结果A₂₆₀/A₂₈₀为1.8~2.0。RT-PCR步骤按照试剂盒使用说明书进行,逆转录为20 μl反应体系,合成cDNA。PCR扩增为25 μl体系,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,在PCR管中分别加入10×Ex-Taq缓冲液2.5 μl、4种脱氧核苷(dNTP Mixture)2 μl、模板DNA 2 μl、随机上下游引物各1 μl、TaKaRa Ex-Taq酶0.125 μl,再加去离子双蒸水至2.5 μl。按下列条件在PCR热循环中进行扩增:95℃ 2 min,94℃ 2 min,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共35个循环。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,Quantity one系统检测PCR产物灰度值,SOCS-3 mRNA表达量用脂肪中SOCS-3与β-actin的PCR产物灰度值的比值来表示。SOCS-3与β-actin的引物序列、长度和退火温度详见表1。

表1 SOCS-3与β-actin的引物序列、长度和退火温度

Tab 1 Sequence, length and annealing temperature of SOCS-3 and β-actin primer

名称	引物	长度, bp	退火温度, °C
SOCS-3	上游: 5'-TCACCACAGCAAGTTTC-3'	282	56.3
	下游: 5'-GGATCGGTAGTCTCTGGTC-3'		
β-actin	上游: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'	764	51.6
	下游: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'		

2.5 统计学处理

采用SPSS17.0系统软件对数据进行处理分析,各组结果分别以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组采用组间两独立样本t检验,检验标准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清中瘦素及体质量的变化

与假手术组比较,模型组大鼠血清中瘦素含量及体质量

均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,MF高剂量组大鼠血清中瘦素含量及体质量均明显降低($P<0.05$),而MF低剂量组上述指标间差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表2。

表2 各组大鼠血清中瘦素含量、体质量比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 Comparison of serum levels of leptin and body weight in rats among those groups($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	瘦素, μg/ml	体质量, g
假手术组	3.13 ± 1.56	238.06 ± 23.43
模型组	5.22 ± 1.68**	268.38 ± 36.54*
MF低剂量组	4.77 ± 1.34	255.43 ± 22.93
MF高剂量组	3.79 ± 1.23*	235.64 ± 27.28*

与假手术组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs. sham operation group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group: * $P<0.05$

3.2 脂肪中SOCS-3 mRNA表达的变化

假手术组、模型组和MF低、高剂量组大鼠脂肪中SOCS-3 mRNA的表达分别为0.51 ± 0.009、0.62 ± 0.081、0.55 ± 0.114、0.49 ± 0.116。与假手术组比较,模型组大鼠脂肪中SOCS-3 mRNA表达明显增加($P<0.05$);与模型组比较,MF高剂量组大鼠脂肪中SOCS-3 mRNA表达明显降低($P<0.05$),而MF低剂量组上述指标间差异无统计学意义($P>0.05$)。电泳图见图1。

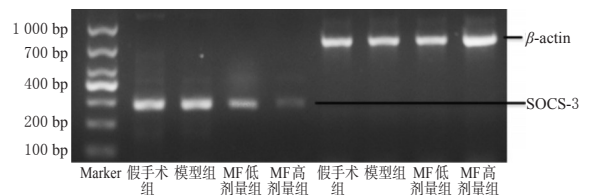


图1 各组大鼠脂肪内SOCS-3 mRNA表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expression of SOCS-3 mRNA in rats among those groups

4 讨论

瘦素是由肥胖基因所编码的一种由167个氨基酸残基组成的分泌型蛋白质,主要由白色脂肪组织分泌^[6],具有调控脂肪及体质量的功能^[7]。大多数肥胖者体内瘦素水平明显高于正常个体,且体内瘦素水平与体质量呈正比关系,因此认为肥胖是瘦素抵抗的结果。本研究结果显示,大鼠去卵巢后体质量明显上升,同时发现血清中瘦素的含量也明显增加,提示大鼠去卵巢后可产生瘦素抵抗。瘦素抵抗是由多种因素引起,有研究表明,瘦素抵抗与SOCS-3的表达有关^[8]。体内存在过多的SOCS-3能够通过阻滞瘦素的信号转导途径,诱导瘦素抵抗的产生。Gu H等^[9]研究发现,在肥胖大鼠体内其脂肪分泌的SOCS-3含量明显增加,而SOCS-3则可通过阻滞瘦素的转导途径,诱导瘦素抵抗的发生。本研究结果显示,去卵巢后大鼠不仅体质量和血清中瘦素含量明显增加,同时脂肪组织中SOCS-3 mRNA的表达明显增加,提示SOCS-3在瘦素抵抗中起着重要作用。高剂量MF连续应用42 d,可显著降低大鼠体质量和血清中瘦素的水平,同时脂肪组织中SOCS-3 mRNA水平亦明显降低,从而改善了瘦素抵抗现象。由此提示,MF通过调节去卵巢大鼠脂肪中SOCS-3 mRNA的表达,继而改善瘦素抵抗现象,发挥降低体质量的作用。关于MF影响去卵巢大鼠肥胖的其他分子学机制,尚有待进一步研究。

参考文献

[1] Fukuda M, Williams KW, Gautron L, et al. Induction of

LC-MS法测定大鼠血浆中利可君的浓度及其药动学研究

赵国珍^{1*}, 张朝晖^{1#}, 谢少斐²(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 南京长澳医药科技有限公司, 南京 210038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3104-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.12

摘要 目的: 建立测定大鼠血浆中利可君浓度的方法, 并研究其药动学。方法: 取大鼠尾静脉注射利可君 1 mg/kg 和灌胃利可君 10 mg/kg ($n=6$), 采用液质联用 (LC-MS) 法, 以替硝唑为内标, 检测给药前和给药后 10、20、30、40、60、90、120、180、240、360、1 440 min 的血药浓度, 并用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。液相色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈, 流动相为乙腈-水-冰醋酸 (20:80:0.3), 梯度洗脱; 质谱条件: 电喷雾离子源, 利可君和替硝唑的选择检测离子质荷比分别为 296.1[M+H]⁺、248.1[M+H]⁺。结果: 利可君检测质量浓度的线性范围为 0.048~30 μg/ml ($r=0.9993$), 定量限为 0.048 μg/ml; 尾静脉注射、灌胃后的药动学参数分别为 c_{\max} : (1.51 ± 0.66)、(17.78 ± 2.67) μg/ml, $t_{1/2}$: (1.23 ± 0.85)、(0.88 ± 0.23) h, AUC_{0-∞}: (1.29 ± 0.56)、(9.87 ± 0.47) μg·h/ml。结论: 本方法准确可靠、检测灵敏, 适用于利可君的血药浓度测定; 利可君在大鼠体内药动学符合一室模型。

关键词 液质联用法; 利可君; 血药浓度; 大鼠; 药动学

Determination of Leucogen Concentration in Rats Plasma by LC-MS and Its Pharmacokinetic Study

ZHAO Guo-zhen¹, ZHANG Chao-hui¹, XIE Shao-fei² (1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China; 2. Nanjing Chang'ao Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of leucogen in rat plasma, and to study its pharmacokinetics. METHODS: Rats were given leucogen 1 mg/kg by tail intravenous administration and leucogen 10 mg/kg by intragastric administration ($n=6$). Using tinidazole as internal standard, LC-MS method was used to detect the plasma concentration of leucogen before and 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 1 440 min after medication; pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software. The determination was performed on a Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid (20:80:0.3) for gradient elution. MS condition: ESI, 296.1 [M+H]⁺ for leucogen, 248.1 [M+H]⁺ for tinidazole. RESULTS: The linear range of leucogen were 0.048-30 μg/ml ($r=0.9993$). The limit of quantification of leucogen was 0.048 μg/ml. Pharmacokinetic parameters of leucogen after tail intravenous administration vs. intragastric administration were as follows as c_{\max} : (1.51 ± 0.66) vs. (17.78 ± 2.67) μg/ml; $t_{1/2}$: (1.23 ± 0.85) vs. (0.88 ± 0.23) h; AUC_{0-∞}: (1.29 ± 0.56) vs. (9.87 ± 0.47) μg·h/ml. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, sensitive for detection and suitable for plasma concentration monitoring of leucogen. Pharmacokinetics of leucogen is in line with one-compartment model.

KEY WORDS LC-MS; Leucogen; Plasma concentration; Rats; Pharmacokinetics

- leptin resistance by activation of cAMP-epac signaling[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(3):331.
- [2] de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, et al. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(1):E187.
- [3] Leblanc ES, O'Connor E, Whitlock EP, et al. Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U.S.[J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155(7):434.
- [4] Bouza C, López-Cuadrado T, Gutierrez-Torres LF, et al. Efficacy and safety of metformin for treatment of overweight and obesity in adolescents: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Obes Facts*, 2012, 5(5):753.
- [5] Yan Li, Kang B, Li G, et al. Effects of metformin on serum levels of sex hormone, leptin and insulin in ovariectomized Sprague-Dawley rats[J]. *Pharmazie*, 2009, 64(12):834.
- [6] Tucholski K, Otto-Buczowska E. The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism[J]. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(3):258.
- [7] Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, et al. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(1):E211.
- [8] Jorgensen SB, O'Neill HM, Sylow L, et al. Deletion of skeletal muscle SOCS-3 prevents insulin resistance in obesity[J]. *Diabetes*, 2013, 62(1):56.
- [9] Gu H, Liu L, Ma S, et al. Inhibition of SOCS-3 in adipocytes of rats with diet-induced obesity increases leptin-mediated fatty acid oxidation[J]. *Endocrine*, 2009, 36(3):546.

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: zhaoguozen516@163.com

通信作者: 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中药资源学与生药。电话: 025-83581286。E-mail: zzh6495@sohu.com

(收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-05-27)