

利拉鲁肽对肥胖大鼠体质量、血脂水平和下丘脑炎症通路的影响研究

崔岩*, 栗红蕊, 孙高洁, 王姣, 王守俊[#](郑州大学第一附属医院内分泌及代谢病科, 郑州 450052)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1571-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.11

摘要 目的:研究利拉鲁肽对肥胖大鼠体质量和血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平及下丘脑炎症通路的影响。方法:取大鼠分别用基础饲料和高脂饲料喂养8周后,分为正常对照组、肥胖组、肥胖-利拉鲁肽组。正常对照组和肥胖组大鼠腹腔注射0.9%氯化钠注射液,肥胖-利拉鲁肽组大鼠腹腔注射利拉鲁肽100 μg/kg,每日2次,连续8周。末次给药后隔夜禁食处死大鼠,称体质量,检测各组大鼠给药前和末次给药后血清中TC、TG水平和下丘脑细胞核因子κB(NF-κB)mRNA及细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS-3)蛋白的表达。结果:与正常对照组比较,肥胖组大鼠体质量和血清中TC、TG水平及下丘脑NF-κB mRNA、SOCS-3蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$);与肥胖组比较,肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量和血清中TC、TG水平及下丘脑NF-κB mRNA、SOCS-3蛋白表达水平均较明显降低($P<0.01$)。结论:利拉鲁肽能显著改善高脂诱导肥胖大鼠的体质量增加、血脂紊乱,其机制可能涉及下丘脑炎症调节通路的改善。

关键词 利拉鲁肽;肥胖;大鼠;下丘脑;细胞核因子κB;细胞因子信号转导抑制因子3

Effects of Liraglutide on Body Weight, Serum Lipid and Hypothalamic Inflammatory Pathway in Obese Rats

CUI Yan, LI Hong-rui, SUN Gao-jie, WANG Jiao, WANG Shou-jun (Dept. of Endocrinology and Metabolic Disease, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of liraglutide on body weight, TC, TG and the expression of hypothalamic inflammatory pathway in obese rats. METHODS: Rats were given basal feed and high-fat diet; 8 weeks later, they were divided into normal control group, obesity group and obesity-liraglutide group. Normal control group and obesity group were given 0.9% Sodium chloride injection intraperitoneally, and obesity-liraglutide group was given liraglutide 100 μg/kg twice a day for consecutive 8 weeks. Rats were sacrificed after fasting overnight following last administration to weigh body weight. The levels of TC and TG in serum, the expression of NF-κB mRNA and SOCS-3 protein were detected before medication and after last medication. RESULTS: Compared with normal control group, body weight, the levels of TC and TG in serum, the expression of NF-κB mRNA and SOCS-3 protein were increased significantly in obesity group ($P<0.01$); compared with obesity group, above index of obesity-liraglutide group were decreased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Liraglutide may significantly improve the increase of body weight and dyslipidemia in high-fat diet induced obese rats, and the mechanism might be associated with the improvement of hypothalamic inflammatory pathways.

KEYWORDS Liraglutide; Obesity; Rats; Hypothalamus; NF-κB; SOCS-3

近年来肥胖的发生率逐年上升,已经成为世界范围的公共卫生问题^[1]。肥胖不仅是脂肪的过度积累,而且与2型糖尿病、动脉粥样硬化、高血压和脂肪肝等疾病的发生密切相关,其带来的心理社会问题也不容忽视^[2]。因此,探索安全、有效、耐受性好、能够降低肥胖相关疾病风险的药物具有重要意义。新型降糖药物利拉鲁肽是一种胰高血糖素样肽1(GLP-1)受体激动药,其不仅具有葡萄糖浓度依赖性促进胰岛素释放、保护胰岛β细胞的功能^[3],也具有抑制食欲及摄食、减轻体质量等作用,提示利拉鲁肽也可能使肥胖者受益^[4]。近年研究发现,肥胖与炎症反应密切相关,表现为系统性的慢性低度炎症状态^[5]。研究表明,基因型和高脂饮食诱导的肥胖大鼠下丘脑炎

性反应较正常大鼠均明显增强,伴随中枢胰岛素抵抗,提示作为机体摄食及能量平衡的调控中枢,抑制下丘脑炎症信号通路对肥胖及其他代谢综合征的治疗具有重要意义^[6-7]。Parthasarathy V等^[8]发现利拉鲁肽具有神经系统保护作用,能够减轻阿尔茨海默病模型大鼠下丘脑中慢性炎症反应。郭南京等^[9]研究也表明,利拉鲁肽可显著改善OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)模型大鼠血清炎症指标。本实验应用利拉鲁肽对高脂喂养建立的肥胖大鼠模型进行干预,观察利拉鲁肽对肥胖大鼠体质量和血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平及下丘脑炎症细胞核因子κB(NF-κB)mRNA及细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS-3)蛋白的影响。

1 材料

1.1 仪器

-80℃低温冰箱(日本Sanyo公司);低温高速离心机(德国Eppendorf公司);美国UVP凝胶成像分析系统、电泳仪和电

* 硕士研究生。研究方向:肥胖与炎症的关系。电话:0371-66295062。E-mail:370482686@qq.com

[#] 通信作者:主任医师,博士。研究方向:糖尿病的发病机制及防治。电话:0371-66295062。E-mail:wangshoujun02@126.com

泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

利拉鲁肽注射液(丹麦诺和诺德制药公司,批号:DP50185,规格:3 ml:18 mg);基础饲料和高脂饲料(河南省动物实验中心);Trizol 新型总 RNA 抽提试剂[宝生物工程(大连)有限公司];反转录和聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(全式金生物技术有限公司);引物均由上海生工生物技术有限公司合成;兔抗大鼠 SOCS-3 抗体(美国 Cell signaling technology 公司); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京博奥森公司);辣根过氧化物酶标记二抗(美国 Bio-rad 公司);大鼠 TG、TC 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国 RD 公司)。

1.3 动物

5 周龄健康清洁级 SD 大鼠 48 只, δ , 体质量 130~160 g, 由河南省动物实验中心提供, 使用许可证号: SCXK(豫)2010-0002。

2 方法

2.1 建模与分组^[10-12]

将 48 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机数字表法分为基础饲料组($n=8$)和高脂饲料组($n=40$)喂养 8 周。以基础饲料喂养的大鼠为正常对照组, 将体质量大于正常对照组大鼠平均体质量+1.96 倍标准差的高脂饲料喂养大鼠分为肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组。正常对照组和肥胖组大鼠腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液(生理盐水), 肥胖-利拉鲁肽组大鼠腹腔注射利拉鲁肽 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[10], 每日 2 次, 连续 8 周。

2.2 标本采集

于实验前和实验开始第 8、16 周, 观察各组大鼠活动、饮食情况和体质量。

于实验开始第 8 周末, 各组大鼠过夜禁食 12 h 采集尾血, 静置 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min(离心半径 100 mm)离心 15 min, 分离血清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。16 周末, 各组大鼠隔夜禁食 12 h 后断头处死, 收集全血, 分离血清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 迅速分离下丘脑组织并置液氮冻存, 待测。

2.3 ELISA 法检测血清中 TC、TG 水平

采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 TC、TG 水平, 步骤严格按照试剂盒说明进行操作, 每组设置 3 个复孔。

2.4 下丘脑中 NF- κ B mRNA 检测

取各组大鼠下丘脑组织约 50 mg, 采用 Trizol 法提取下丘脑总 RNA, 检测 RNA 浓度及纯度, 反转录得到 cDNA, 进行 PCR 反应。上下游引物分别为 β -actin: 5'-TGGAATCCTGTG-GCATCCATGAAAC-3'、5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACA-GTCCG-3', 扩增片段长度 349 bp; NF- κ B: 5'-GAGAGCCCTT-GCATCCTTTA-3'、5'-CTTCCCTTTGGTCTTTCTGT-3', 扩增片段长度 100 bp。NF- κ B 基因扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56.4 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物均进行 2% 琼脂糖凝胶电泳成像, 目的条带与 β -actin 条带吸光度比值进行 NF- κ B mRNA 表达半定量结果分析。

2.5 下丘脑中 SOCS-3 蛋白检测

配制裂解液为苯甲磺酰氟(PMSF)-细胞组织快速裂解液(RIPA)(1:99, 现用现配)。取各组大鼠下丘脑组织 50 mg, 加入 500 μl 裂解液, 置于高通量组织匀浆机匀浆, 冰浴静置 15

min 后取上清, BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。取待测蛋白样品 37.5 μg , 100 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 使蛋白变性, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 转移至硝酸纤维素膜上, 封闭液室温封闭 2 h, 加入兔抗大鼠 SOCS-3 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次, Image Studio Ver 2.0 软件测灰度值, 计算其与 β -actin 的比值。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行统计处理, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基本情况

实验过程中, 正常对照组大鼠活动好, 饮食正常; 肥胖组食欲旺盛, 肥胖-利拉鲁肽组较肥胖组摄食减少, 两组大鼠活动量均减少; 至实验结束时未有大鼠死亡。

3.2 指标结果

实验前, 基础饲料组与高脂饲料组大鼠的体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验开始 8 周末, 将高脂饲料组大鼠中 17 只体质量是基础饲料组平均体质量+1.96 倍标准差的大鼠分为肥胖组, 肥胖发生率为 42.5%。与基础饲料组比较, 肥胖组大鼠体质量和血清中 TC、TG 水平均明显升高($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 大鼠不同时间体质量和血清中 TC、TG 水平比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Comparison of body weight and serum level of TC and TG at different time($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	体质量, g	TC, mmol/L	TG, mmol/L
第 0 周	基础饲料组	8	168.75 \pm 7.025		
	高脂饲料组	40	165.58 \pm 12.926		
第 8 周	基础饲料组	8	379.63 \pm 17.171	1.48 \pm 0.10	0.755 \pm 0.077
	肥胖组	17	430.94 \pm 10.662*	2.84 \pm 0.20*	1.090 \pm 0.095*

与基础饲料组比较: * $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$

16 周末, 与正常对照组比较, 肥胖组和肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量和 TC、TG 水平均明显升高($P < 0.01$); 与肥胖组比较, 肥胖-利拉鲁肽组大鼠体质量和 TC、TG 水平均明显降低($P < 0.01$), 结果见表 2。

表 2 大鼠给药后体质量和血清中 TC、TG 水平比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Comparison of body weight and serum level of TC and TG after medication($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量, g	TC, mmol/L	TG, mmol/L
正常对照组	8	505.50 \pm 11.686	1.56 \pm 0.09	0.885 \pm 0.098
肥胖组	8	546.00 \pm 10.677*	3.35 \pm 0.18*	1.370 \pm 0.096*
肥胖-利拉鲁肽组	9	525.63 \pm 8.815**	1.90 \pm 0.18**	0.993 \pm 0.076**

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与肥胖组比较: # $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. obesity group: # $P < 0.01$

3.3 下丘脑中 NF- κ B mRNA 和 SOCS-3 蛋白表达

与正常对照组比较, 肥胖组大鼠下丘脑中 NF- κ B mRNA 和 SOCS-3 蛋白表达均明显升高($P < 0.01$); 与肥胖组比较, 肥胖-利拉鲁肽组大鼠下丘脑中 NF- κ B mRNA 和 SOCS-3 蛋白表达均明显降低($P < 0.01$), 电泳图见图 1, 结果见表 3。

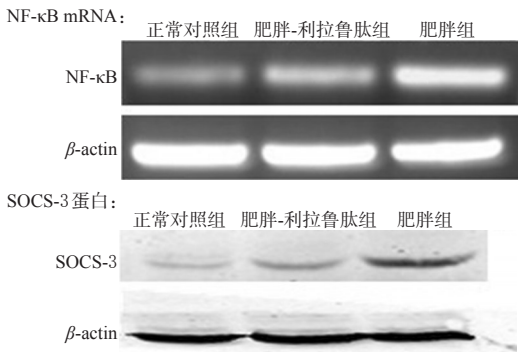


图1 大鼠下丘脑中NF-κB mRNA和SOCS-3蛋白表达电泳图
Fig 1 Electrophoregram of the expression of NF-κB mRNA and SOCS-3 protein in hypothalamus of rats

表3 大鼠下丘脑中NF-κB mRNA及SOCS-3蛋白表达灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of the expression of NF-κB mRNA and SOCS-3 protein in hypothalamus of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB/β-actin	SOCS-3/β-actin
正常对照组	8	0.151 ± 0.061	0.103 ± 0.021
肥胖组	8	0.591 ± 0.048*	0.569 ± 0.031*
肥胖-利拉鲁肽组	9	0.375 ± 0.031 [#]	0.228 ± 0.032 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与肥胖组比较: [#] $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. obesity group: [#] $P < 0.01$

4 讨论

肥胖是机体脂肪堆积过多和(或)分布异常、体质量增加,是包括遗传、环境、心理因素等多种因素相互作用引起的慢性代谢性疾病。近年来,大量的研究发现肥胖个体通常伴随着炎症因子分泌的增加,呈现慢性低度炎症状态^[5],IKKβ/NF-κB通路的激活发挥着重要的作用^[13]。作为肥胖发生重要危险因素的高脂饮食可以与免疫系统交互作用,导致肥胖及相关代谢综合征炎症反应的发生。

GLP-1是肠道L细胞在进食后分泌的一种重要的肽类激素,具有优异的糖调节功能,在糖尿病治疗方面具有广阔的应用前景^[14]。目前关于GLP-1能否缓解肥胖状态下下丘脑炎症反应的研究较少,故本文研究了GLP-1长效类似物利拉鲁肽对肥胖大鼠体质量和血清中TC、TG及下丘脑炎症通路的影响。

下丘脑能够整合多种神经、内分泌、营养有关的信号,在调节代谢和维持能量平衡方面均具有重要功能^[15]。肥胖状态下IKKβ/NF-κB通路的激活和SOCS-3等相关因子表达显著增加^[16],可抑制下丘脑神经核团内胰岛素和瘦素信号转导,影响神经肽γ等多种神经内分泌激素的分泌及交感神经活性,引起食欲增加及机体能量消耗减少,从而加剧肥胖和相关代谢性疾病的发展^[17]。而Hölscher C等^[18]的研究表明,GLP-1能够穿过血脑屏障,其受体广泛分布于下丘脑,具有神经保护作用,可促进神经元的发生,抑制凋亡和氧化应激,减少退行性神经系统疾病神经元内空斑形成和慢性炎症反应。

本实验结果表明,利拉鲁肽能显著改善高脂诱导肥胖大鼠体质量增加、血脂紊乱,其机制可能涉及下丘脑炎症调节通路的改善。

参考文献

[1] Sharma M, Branscum P. Novel and emerging approaches

to combat adolescent obesity[J]. *Adolescent Health Medicine and Therapeutics*, 2010, 1(9):9.

[2] Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(6):723.

[3] 陈群峰,王永祥.利拉鲁肽临床研究进展[J].*世界临床药物*, 2013, 34(5):312.

[4] 马培奇.抗肥胖药物研究进展[J].*上海医药*, 2013, 34(5):52.

[5] 詹莉莉,杨志秋,傅正伟.肥胖与慢性炎症的研究进展[J].*中国细胞生物学学报*, 2011, 33(3):297.

[6] Zhang X, Zhang G, Zhang H. Hypothalamic IKKβ/NF-κB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity[J]. *Cell*, 2008, 135(1):61.

[7] Kleinridders A, Könnert AC, Brüning JC. CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6):794.

[8] Parthasarathy V, Hölscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 700(1/3):42.

[9] 郭南京,孙嘉,湛奕,等.利拉鲁肽对糖耐量异常大鼠血清炎症指标的影响[J].*山东医药*, 2012, 52(17):7.

[10] 洪涛,董艳华,涂晶,等.利拉鲁肽对肥胖大鼠胰岛素敏感性的影响[J].*中国医药科学*, 2012, 2(13):57.

[11] Liu JY, Liu Y, Chen L, et al. Glucagon-like peptide-1 analog liraglutide protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2013;630-537.

[12] 王晓珂.炎症反应与高脂饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗关系的研究[D].武汉:华中科技大学,2011:27.

[13] Li J, Tang Y, Cai D. IKKβ/NF-κB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(10):999.

[14] 母义明.基于肠促胰素治疗的药物比较:GLP-1类似物利拉鲁肽的临床优势[J].*中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(9):8.

[15] Velloso LA, Torsoni MA, Araujo EP. Hypothalamic dysfunction in obesity[J]. *Rev Neurosci*, 2009, 20(5/6):441.

[16] García-cáceres C, Yi CX, Tschöp MH. Hypothalamic astrocytes in obesity[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2013, 42(1):57.

[17] Arruda AP, Milanski M, Coope A, et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4):1314.

[18] Hölscher C. Potential role of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection[J]. *CNS Drugs*, 2012, 26(10):871.

(收稿日期:2013-12-10 修回日期:2014-02-13)