

## ◇ 药学研究 ◇

西格列汀对肥胖大鼠血清及不同组织  
视黄醇结合蛋白 4 表达水平的影响戚仁娟<sup>1</sup>, 胡红琳<sup>1</sup>, 夏莉<sup>1</sup>, 刘炯炯<sup>1</sup>, 王长江<sup>1</sup>, 方朝晖<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究西格列汀对肥胖大鼠代谢指标、血清视黄醇结合蛋白 4 (RBP4) 及附睾脂肪、肝脏组织 RBP4 表达水平的影响。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组 (ND 组  $n=10$ ) 和高脂组 (HD 组  $n=30$ )。16 周后 HD 组成功建立肥胖模型 ( $n=16$ ) 并随机分为肥胖对照组 (OB 组  $n=8$ )、西格列汀干预组 (SITA 组  $n=8$ )。分别测定干预前后体重 (BW)、空腹血糖 (FBG)、三酰甘油 (TG)、胆固醇 (TCH)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、空腹胰岛素 (FINS) 及血清 RBP4 水平,并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。Western blot 法检测大鼠附睾脂肪和肝脏组织 RBP4 表达水平。结果 ① 与 ND 组相比,HD 组 BW、FBG、TG、TCH、LDL-C、FINS、HOMA-IR、RBP4 升高, HDL-C 降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。在 HD 组中,OB 组、SITA 组间各指标差异无统计学意义。西格列汀干预后, SITA 组较 OB 组 FBG、TG、TCH、LDL-C、FINS、HOMA-IR、RBP4 降低, HDL-C 升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。② 与 ND 组比较,OB 组附睾脂肪 RBP4 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 OB 组相比, SITA 组附睾脂肪 RBP4 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。③ Pearson 相关分析显示 ND 组、血清 RBP4 与 TG 呈正相关性; HD 组、血清 RBP4 与 FINS、HOMA-IR、TG、附睾脂肪 RBP4 呈正相关性, 与 HDL-C 呈负相关性。结论 肥胖大鼠血清 RBP4 水平升高, 附睾脂肪 RBP4 表达水平增高。西格列汀干预能显著降低肥胖大鼠血清 RBP4 水平及附睾脂肪中 RBP4 蛋白表达水平, 并可改善糖脂代谢。

**关键词** 肥胖症; 胰岛素抵抗; 西格列汀; 视黄醇结合蛋白 4  
中图分类号 R 589.25

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0185-05

2014-09-20 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2013Z126); 安徽中医学院中医药管理局重点学科-中医内分泌学科开放基金 (编号: 2011nfmk004); 国家自然科学基金青年科学基金培养计划 (编号: 2011KJ11)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

<sup>2</sup>安徽中医药大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230031

作者简介: 戚仁娟, 女, 硕士研究生;

王长江, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chjw82@126.com;

夏莉, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: xiaLi0205@163.com

脂肪组织不仅是能量储存器官, 还是活跃的内分泌器官, 可以分泌众多与代谢相关的脂肪因子, 如内脏脂肪素、瘦素、视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein 4, RBP4) 等<sup>[1]</sup>。这些脂肪因子在肥胖患者胰岛素抵抗的发生与心血管并发症的发生中起重要作用。研究<sup>[2]</sup>表明, 肥胖患者血清 RBP4 水平升高。目前, RBP4 与肥胖的相关研究备受关注, 但在人体中的作用及其调节机制尚不明确。西格列汀作为二肽基肽酶-4 (dipeptide peptidase-4, DPP-4) 抑制剂, 具有刺激胰岛  $\beta$  细胞再生、促进胰岛素分泌、抑制内源性葡萄糖的生成, 达到降低血糖的作用, 但西格列汀与肥胖患者 RBP4 的相关研究较少。该研究通过建立高脂饮食诱导的肥胖大鼠模型, 给予西格列汀干预, 测定肥胖大鼠干预前后血清 RBP4 水平及附睾脂肪、肝脏组织 RBP4 的表达水平, 分析西格列汀干预对 RBP4 的可能作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及饲料** 40 只普通级 4 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 (body weight, BW) 80 ~ 120 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。普通饲料由安徽医科大学实验动物中心配制, 为国家标准啮齿类动物固体混合饲料。高脂饲料配方为普通饲料 55%、猪油 12%、蔗糖 5%、奶粉 8%、花生 5%、鸡蛋 10%、麻油 3%、食盐 2%。

**1.2 实验试剂** 西格列汀 (美国默沙东公司); 胰岛素放免试剂盒 (北京原子高科公司); RBP4 酶免试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司); 稳豪血糖仪及试纸 (美国强生公司); RBP4 一抗 (英国 Abcam 公司); RBP4 二抗、 $\beta$ -actin 一抗、 $\beta$ -actin 二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.3 动物分组及肥胖大鼠模型建立** 将 40 只大鼠予以普通饲料适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组 (ND 组  $n=10$ ) 予普通饲料喂养, 高脂组 (HD 组  $n=30$ ) 予高脂饲料喂养。两组大鼠平行饲养, 自由饮水, 室温 21 ~ 24 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 自然昼夜节律。每 2 周称重 1 次, 喂养 16 周后, 取 HD

组 BW 大于 ND 组 BW 均数 20%<sup>[3]</sup> 的大鼠 (n = 16) 判定为肥胖造模成功的大鼠, 将其随机分为肥胖对照组 (OB 组, n = 8) 和西格列汀干预组 (SITA 组, n = 8)。

**1.4 干预方法** SITA 组给予西格列汀灌胃 10 mg/(kg · d), ND 组和 OB 组均以等剂量生理盐水灌胃, 共干预 6 周; 干预期间 ND 组继续普通饮食, OB 组和 SITA 组继续高脂饮食。

**1.5 标本采集及检测** 16 周末空腹状态下取内眦静脉采血 2 ml, 静置 15 min 后, 3 200 r/min 离心 10 min, 血清放置于 -80 °C 冰箱保存待测。22 周末次干预后禁食 12 h 但不禁水, 称重后水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射, 麻醉状态下打开腹腔, 下腔静脉取血 7 ml, 静置 15 min 后, 3 200 r/min 离心 10 min, 血清放置于 -80 °C 冰箱保存待测。麻醉状态下解剖大鼠, 冰上操作取出附睾脂肪及肝脏组织, 置于液氮罐中以便提取蛋白质。血糖仪纸片法测定血糖, Roche Modular 全自动生化分析仪测定血脂, 放免法测定胰岛素, ELISA 法测定血清 RBP4, 采用胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR) 模型公式<sup>[4]</sup> 计算。HOMA-IR = 空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS) (mIU/L) × 空腹血糖 (fast blood glucose, FBG) (mmol/L) / 22.5。

**1.6 Western blot 法检测** 提取附睾脂肪中的总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 根据蛋白浓度决定上样量。依次进行电泳、转膜、封闭, RBP4 兔抗一抗 (1 : 500) 4 °C 孵育过夜后, 辣根酶标记的山羊抗兔二抗 (1 : 4 000) 室温下孵育 2 h。充分洗涤后加入 ECL 化学发光剂, 暗室显影成像。检测后的膜重新用 TBST 清洗 3 次, TBS 清洗 1 次 (10 min/次), 重复上述步骤进行内参照 β-actin (一抗 1 : 1 000 稀释, 二抗 1 : 4 000 稀释) 的结合。采用上述相同方法, 在相同条件下完成肝脏组织 RBP4 和对应的 β-actin 蛋白检测。RBP4 蛋白相对表达量以其特异性结合条带与 β-actin 结合条带的灰度值比值表示。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组均数比较用配对 t 检验, 3 组均数间比较采用 ANOVA 及两两比较的 LSD 法; 一个应变变量与单个自变量之间的关系用 Pearson 相关性分析。

## 2 结果

**2.1 干预前各组大鼠代谢指标比较** 与 ND 组相比, OB、SITA 组大鼠 BW、FBG、三酰甘油 (triglycer-

ide, TG)、胆固醇 (total cholesterol, TCH)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL-C)、FINS、HOMA-IR 明显升高, 高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL-C) 降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01); 在 HD 组中, OB 组、SITA 组两组间各指标差异无统计学意义。见表 1。

表 1 干预前各组大鼠代谢指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	ND 组 (n=10)	OB 组 (n=8)	SITA 组 (n=8)	F 值
BW (g)	398.35 ± 31.10	490.98 ± 41.21**	488.01 ± 36.70**	19.598
FBG (mmol/L)	4.74 ± 0.53	7.20 ± 0.93**	7.53 ± 0.89**	34.915
TG (mmol/L)	0.50 ± 0.16	0.79 ± 0.25*	0.80 ± 0.25**	5.698
TCH (mmol/L)	1.70 ± 0.32	2.39 ± 0.49**	2.42 ± 0.40**	9.482
HDL-C (mmol/L)	0.76 ± 0.24	0.45 ± 0.14**	0.46 ± 0.14**	8.105
LDL-C (mmol/L)	0.94 ± 0.29	1.88 ± 0.40**	1.89 ± 0.23**	28.132
FINS (mIU/L)	9.33 ± 1.86	17.52 ± 2.38**	16.41 ± 2.21**	39.809
HOMA-IR	1.97 ± 0.48	5.60 ± 1.02**	5.55 ± 1.33**	42.416

与 ND 组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

**2.2 干预后各组大鼠代谢指标比较** 西格列汀干预 6 周后, SITA 组大鼠的 FBG、TG、TCH、LDL-C、FINS、HOMA-IR 下降, HDL-C 升高, 与 OB 组相比, 差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01); 与 ND 组相比, 差异无统计学意义。西格列汀干预后, 与 OB 组相比, SITA 组大鼠 BW 有下降趋势, 但差异无统计学意义。见表 2。

表 2 干预后各组大鼠代谢指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	ND 组 (n=10)	OB 组 (n=8)	SITA 组 (n=8)	F 值
BW (g)	409.40 ± 28.31	494.24 ± 53.84**	474.38 ± 36.65	11.251
FBG (mmol/L)	5.24 ± 0.78	7.56 ± 0.83**	5.25 ± 1.06##	18.740
TG (mmol/L)	0.49 ± 0.18	0.84 ± 0.22**	0.52 ± 0.12#	9.731
TCH (mmol/L)	1.74 ± 0.35	2.42 ± 0.48**	1.95 ± 0.27#	7.524
HDL-C (mmol/L)	0.82 ± 0.22	0.50 ± 0.18**	0.73 ± 0.20#	5.629
LDL-C (mmol/L)	0.92 ± 0.25	1.92 ± 0.37**	1.22 ± 0.40##	19.895
FINS (mIU/L)	9.43 ± 2.13	17.36 ± 2.44**	10.06 ± 2.01##	33.812
HOMA-IR	2.22 ± 0.71	5.85 ± 1.23**	2.35 ± 0.65##	45.230

与 ND 组比较: \*\* P < 0.01; 与 OB 组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

**2.3 干预前后各组大鼠血清 RBP4 水平比较** 干预前, HD 组大鼠血清 RBP4 水平升高, 与 ND 组相比, 差异有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01); 在 HD 组中, OB 组、SITA 组两组间比较差异无统计学意义。西格列汀干预后, SITA 组血清 RBP4 水平下降, 与干预前相比, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 与 OB 组相比, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 但仍高于 ND 组。见表 3。

**2.4 脂肪及肝脏组织中 RBP4 的表达** 与 ND 组

相比,OB 组附睾脂肪 RBP4 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 OB 组相比,SITA 组附睾脂肪 RBP4 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。在肝脏组织中 3 组 RBP4 表达差异无统计学意义。见图 1。

表 3 干预前后各组大鼠血清 RBP4 水平变化( $\bar{x} \pm s$ )

项目	ND 组(n=10)	OB 组(n=8)	SITA 组(n=8)	F 值
干预前(μmol/L)	33.34 ± 6.35	41.42 ± 4.70**	39.86 ± 5.62*	5.265
干预后(μmol/L)	30.88 ± 2.40	42.52 ± 6.34**	35.04 ± 2.61###	18.338

与 ND 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 OB 组比较: ###  $P < 0.01$

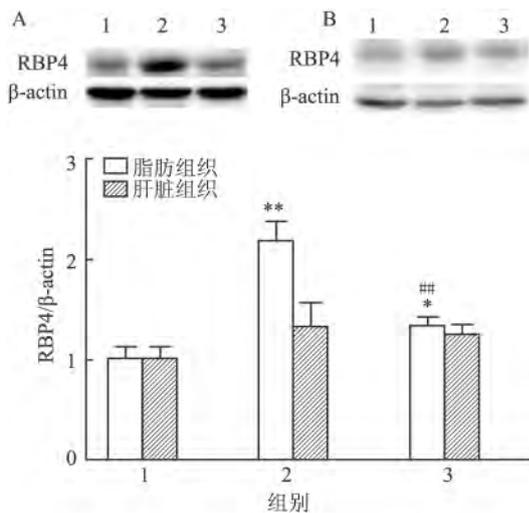


图 1 附睾脂肪和肝脏组织 RBP4 表达水平的比较

1: ND 组; 2: OB 组; 3: SITA 组; A: 附睾脂肪组织; B: 肝脏组织; 与 ND 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 OB 组比较: ###  $P < 0.01$

**2.5 血清 RBP4 与各指标间的相关性分析** 以 ND 组大鼠为研究对象, Pearson 相关分析显示血清 RBP4 与 TG 呈正相关性, 与其他指标无相关性。以 HD 组大鼠为研究对象, Pearson 相关分析显示血清 RBP4 与 FINS、HOMA-1R、TG、附睾脂肪 RBP4 呈正相关性, 与 HDL-C 呈负相关性, 与 BW、FBG、TCH、LDL-C、肝脏 RBP4 均无相关性, 见表 4。

表 4 RBP4 与各指标间的相关性分析

指标	ND 组		HD 组	
	r 值	P 值	r 值	P 值
BW	0.060	0.869	0.225	0.402
FBG	0.528	0.117	0.330	0.212
TG	0.685	0.029	0.570	0.021
TCH	0.326	0.358	-0.345	0.190
HDL-C	0.295	0.407	-0.536	0.032
LDL-C	-0.261	0.466	-0.339	0.198
FINS	0.005	0.989	0.619	0.011
HOMA-1R	0.243	0.499	0.581	0.018
肝脏 RBP4	0.710	0.498	0.574	0.234
附睾脂肪 RBP4	-0.255	0.836	0.813	0.049

### 3 讨论

RBP4 是新近被发现的作用于肌肉和肝脏, 并影响胰岛素敏感性的脂肪因子。RBP4 主要由肝脏和脂肪组织合成, 可以将视黄醇从肝脏转运至各种靶组织<sup>[5]</sup>。当 RBP4 在脂肪组织表达过多时可导致葡萄糖转运体 4 (glucose transport 4, GLUT4) 表达下降, 抑制肝脏和肌肉组织对葡萄糖的利用<sup>[6]</sup>。RBP4 导致胰岛素抵抗的机制为 RBP4 水平升高可使肝脏产生过多的磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶, 导致糖异生增加, 并且通过 IRS-1 和 PI3K 途径导致肌肉组织胰岛素信号传导减弱<sup>[2, 7-8]</sup>。

本研究显示高脂饮食诱导的肥胖大鼠血清 RBP4 水平及附睾脂肪 RBP4 表达水平较 ND 组升高, 肝脏组织中 RBP4 表达量较 ND 组无明显改变, 这提示 RBP4 虽然主要由肝脏和脂肪组织合成, 但在肥胖状态下, 血清中增高的 RBP4 水平可能主要来源于脂肪组织。Yang et al<sup>[2]</sup> 发现在肥胖模型鼠中, 脂肪组织 RBP4 表达水平明显增加, 而肝脏组织 RBP4 表达水平不变, 与本实验结果一致。Pearson 相关性分析显示, 在肥胖大鼠中, 血清 RBP4 水平与 HOMA-1R 呈正相关性, 与研究<sup>[7]</sup> 结果一致。但 Lewis et al<sup>[9]</sup> 发现 RBP4 与胰岛素抵抗并无相关性, 这可能与实验对象、样本含量及试验方法不同有关。同时本研究显示在肥胖大鼠中, 血清 RBP4 与 TG 呈正相关性, 与 HDL-C 呈负相关性, 这与 RBP4 对肝脏的直接作用, 导致肝脏产生 TG 过多, 并促进极 LDL-C 释放入血有关<sup>[10]</sup>。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是肠促胰岛素家族中的一员, 具有促进胰岛素分泌, 抑制胰高糖素释放, 抑制胃排空, 保护并增加胰岛 β 细胞数量, 促进胰岛 β 细胞存活与生长、增殖与分化、抑制其凋亡等作用<sup>[11]</sup>。西格列汀作为 DPP-4 抑制剂, 通过选择性抑制 DPP-4 活性, 减少体内 GLP-1 降解, 增加体内 GLP-1 浓度, 促进胰岛素分泌、降低血糖、保护胰岛 β 细胞功能<sup>[12]</sup>。

目前关于西格列汀对肥胖大鼠 RBP4 蛋白表达有无影响的相关报道较少。本研究通过给予肥胖大鼠西格列汀干预 6 周来观察 RBP4 表达水平的变化, 结果表明西格列汀干预后, 血清 RBP4 水平及附睾脂肪 RBP4 表达水平下降, 且糖脂代谢明显改善, 与研究<sup>[4]</sup> 结果类似。研究<sup>[13]</sup> 显示另一种 DPP-4 抑制剂维格列汀亦能降低 2 型糖尿病患者血清 RBP4 水平, 与本实验结果一致。西格列汀干预后, 脂肪组

织 RBP4 蛋白表达水平下降,而肝脏组织 RBP4 蛋白表达水平无明显改变,这与胰岛素增敏剂罗格列酮对 GLUT4 敲除鼠不同组织 RBP4 表达影响的研究<sup>[2]</sup>结果一致。西格列汀降低 RBP4 蛋白表达水平的机制目前尚不完全明确,可能为降低了 FBG 和胰岛素,改善胰岛素抵抗,RBP4 适应性下调。另有研究<sup>[14]</sup>表明 GLP-1 干预后糖尿病模型鼠脂肪组织 GLUT4 表达水平增加,而 RBP4 水平与 GLUT4 水平呈负相关性<sup>[15]</sup>。随着 GLUT4 表达水平增加,RBP4 表达水平下降,因此推测,西格列汀干预后 RBP4 表达水平下调与体内 GLP-1 浓度增加及 GLUT4 表达水平增加有关联。

综上所述,肥胖大鼠血清及附睾脂肪中 RBP4 水平升高,西格列汀干预后能显著降低肥胖大鼠血清及脂肪组织 RBP4 水平,并可改善糖脂代谢。RBP4 作为新的脂肪因子,在肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病的发生发展过程中扮演着重要的角色。降低 RBP4 水平可能会成为肥胖症、2 型糖尿病的治疗新靶点之一。

### 参考文献

- [1] Jung U J, Choi M S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6184–223.
- [2] Yang Q, Graham T E, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2005, 436(7049): 356–62.
- [3] 王磊,陈虹. 幼年雄性 SD 大鼠营养性肥胖模型的建立 [J]. *药物研究*, 2010, 19(17): 6–7.
- [4] Derosa G, Carbone A, D'Angelo A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating sitagliptin action on insulin resistance parameters and  $\beta$ -cell function [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, 13(17): 2433–42.
- [5] Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine [J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 165(5): 703–11.
- [6] Chavarria N, Kato T S, Khan R, et al. Increased levels of retinol binding protein 4 in patients with advanced heart failure correct after hemodynamic improvement through ventricular assist device placement [J]. *Circ J*, 2012, 76(9): 2148–52.
- [7] Saki F, Ashkani-Esfahani S, Karamizadeh Z. Investigation of the relationship between retinol binding protein 4, metabolic syndrome and insulin resistance in Iranian obese 5–17 year old children [J]. *Iran J Pediatr*, 2013, 23(4): 396–402.
- [8] Cho Y M, Youn B S, Lee H, et al. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(11): 2457–61.
- [9] Lewis J G, Shand B I, Elder P A, et al. Plasma retinol-binding protein is unlikely to be a useful marker of insulin resistance [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 80(1): e13–5.
- [10] El-Sayed M M, Ghareeb D A, Talat H A, et al. High fat diet induced insulin resistance and elevated retinol binding protein 4 in female rats; treatment and protection with *Berberis vulgaris* extract and vitamin A [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2013, 26(6): 1189–95.
- [11] Plosker G L. Sitagliptin: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2014, 74(2): 223–42.
- [12] Vardarli I, Arndt E, Deacon C F, et al. Effects of sitagliptin and metformin treatment on incretin hormone and insulin secretory responses to oral and “isoglycemic” intravenous glucose [J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 663–74.
- [13] Derosa G, Ragonesi P D, Carbone A, et al. Vildagliptin action on some adipocytokine levels in type 2 diabetic patients: a 12-month, placebo-controlled study [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, 13(18): 2581–91.
- [14] Villanueva-Peñacarrillo M L, Puente J, Redondo A, et al. Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models [J]. *Endocrine*, 2001, 15(2): 241–8.
- [15] Zhang W, Xu Y C, Guo F J, et al. Anti-diabetic effects of cinnamaldehyde and berberine and their impacts on retinol-binding protein 4 expression in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(21): 2124–8.

## Effects of treatment with sitagliptin on serum and different tissue retinol binding protein 4 expression levels in high-fat-fed obesity rats

Qi Renjuan, Hu Honglin, Xia Li, et al

(Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To evaluate the effects of treatment with sitagliptin on metabolic parameters, serum retinol binding protein 4 (RBP4) levels, epididymal adipose tissue and liver RBP4 expression levels in high-fat-fed obese rats. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into normal diet group (ND group,  $n = 10$ ) and high fat diet

◇ 临床医学研究 ◇

## 体外贮存致悬浮红细胞凋亡损伤的研究

马文娟<sup>1</sup>, 卞茂红<sup>1</sup>, 郑美娟<sup>2</sup>, 乔金平<sup>2</sup>, 王峰<sup>3</sup>, 许哲<sup>3</sup>, 马胜利<sup>4</sup>, 沈继龙<sup>5</sup>

**摘要** 目的 探讨贮存期内不同保存时间致悬浮红细胞凋亡损伤及可能的机制。方法 采集 12 例健康献血员血液, 常规去除白细胞和血浆。取保存后 3、11、19、27、35 d 5 个时相点的红细胞, 用凋亡试剂染色经流式细胞仪检测红细胞凋亡率及红细胞体积大小变化, 用 Fluo-3 AM 染色经流式细胞仪检测细胞内  $Ca^{2+}$  浓度。同时留取上清液, 利用酶标仪检测血红蛋白在 405 nm 的吸光度。结果 与保存 3 d 的红细胞比较, 红细胞凋亡率和细胞内  $Ca^{2+}$  浓度逐渐增加, 至 27 d 与 35 d 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 溶血率早期增加不明显, 至 35 d 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而

红细胞体积逐渐变小, 至 27 d 与 35 d 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 体外贮存的悬浮红细胞随着保存时间的延长, 凋亡逐渐增加, 可能是储存损伤的原因之一。 $Ca^{2+}$  内流可能是凋亡主要的发生机制。

**关键词** 悬浮红细胞; 储存损伤; 红细胞凋亡; 钙离子

中图分类号 R 333.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0189-05

目前临床使用的血液成分绝大多数是悬浮红细胞, 保存期为 35 ~ 42 d<sup>[1]</sup>。血液在储存过程中由于受多种因素的影响, 其形态、功能和生化特性等均发生不同程度的变化; 且随着储存时间的延长, 变化更加显著, 这些变化统称为红细胞储存损伤, 严重影响血液的质量及患者的输注效果, 给临床输血带来安全隐患<sup>[2]</sup>。储存损伤可能由红细胞自身代谢产物、氧化损伤、酶和红细胞程序性死亡即红细胞凋亡引起<sup>[3]</sup>。然而对其研究报道非常有限。该研究旨在进一步明确悬浮红细胞贮存过程中的凋亡损伤情况及可能的发生机制, 为研究储存损伤积累科学依据。

2014-10-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30940067)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 输血科、<sup>2</sup> 检验科, 合肥 230022

河南省永城市人民医院<sup>3</sup> 麻醉科、<sup>4</sup> 感染科, 永城 476600

<sup>4</sup> 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 马文娟, 女, 硕士研究生;

卞茂红, 男, 副教授, 副主任技师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: mhbian@126.com

group (HD group,  $n = 30$ ). 16 weeks later, obese models ( $n = 16$ ) were established from HD group and were randomly divided into obesity group (OB group,  $n = 8$ ) and sitagliptin group (SITA group,  $n = 8$ ). Measure body weight (BW), fasting blood glucose (FBG), triglyceride (TG), total cholesterol (TCH), high-density lipoprotein (HDL-C), low-density lipoprotein (LDL-C), fasting insulin (FINS), serum RBP4 respectively before and after the 6 weeks of treatment, and calculate homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR). Western blot was used to detect the epididymal adipose tissue and liver RBP4 protein expression levels. **Results** ① The levels of BW, FBG, TG, TCH, LDL-C, FINS, HOMA-IR and serum RBP4 in HD group increased while the levels of HDL-C decreased compared with those of ND group with a statistical significance ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The differences between OB group and SITA group were of no statistical significance. After treatment with sitagliptin, the levels of FBG, TG, TCH, LDL-C, FINS, HOMA-IR and serum RBP4 of SITA group decreased while the levels of HDL-C increased compared with those of OB group with a statistical significance ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). ② Epididymal adipose tissue RBP4 protein expression levels in OB group increased compared with ND group ( $P < 0.05$ ), epididymal adipose tissue RBP4 protein expression levels in SITA group decreased compared with OB group ( $P < 0.01$ ). ③ Pearson correlation analysis showed that in ND group, serum RBP4 was positively correlated with TG. In HD group, serum RBP4 and FINS, HOMA-IR, TG, epididymal adipose tissue RBP4 were positively correlated and negative correlation existed between serum RBP4 and HDL-C. **Conclusion** Serum and epididymal adipose tissue RBP4 protein levels are elevated in obesity rats. Sitagliptin intervention can lower serum and epididymal adipose tissue RBP4 protein levels in obesity rats and improve the glucose and lipid metabolism.

**Key words** obesity; insulin resistance; sitagliptin; retinol binding protein 4