

## 西格列汀对 2 型糖尿病大鼠 chemerin 水平的影响

刘炯炯<sup>1</sup>, 王长江<sup>1</sup>, 胡红琳<sup>1</sup>, 戚仁娟<sup>1</sup>, 夏莉<sup>1</sup>, 方朝晖<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究西格列汀干预对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠各代谢指标及脂肪因子 chemerin 水平的影响及其可能的机制,并探讨脂肪因子 chemerin 与 T2DM 的关系。方法 将 35 只雄性 SD 大鼠随机分为普通饲料喂养组 (NC 组  $n=10$ ) 及高脂饲料喂养组 (HF 组  $n=25$ ),12 周后将高脂饮食喂养的大鼠腹腔一次性注射链脲佐菌素 (STZ) 35 mg/kg, T2DM 大鼠造模成功 ( $n=20$ ) 后随机分为两组: T2DM 对照组 (T2DM 组  $n=10$ )、西格列汀干预组 (SP 组  $n=10$ )。ELISA 法分别测定干预前后各组大鼠生化指标, Western blot 法检测大鼠肾周脂肪、肝脏和肌肉组织 chemerin 蛋白表达水平。结果 ① T2DM 大鼠的血清 chemerin、体重 (BW)、空腹血糖 (FBG)、胰岛素 (FINS)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL)、胰岛素抵抗指数 (HOMO-IR) 与 NC 组比较均增高, 胰岛  $\beta$  细胞功能指数 (HOMO- $\beta$ ) 降低, 肾周脂肪、肝脏及肌肉组织的 chemerin 蛋白表达量增加; ② 西格列汀可降低 T2DM 大鼠 FBG、FINS、TC、TG、LDL、HOMO-IR、血清 chemerin 水平及肾周脂肪、肝脏组织的 chemerin 蛋白表达量, 提高 HOMO- $\beta$  指数; ③ 相关性分析显示西格列汀干预前后 TG、FINS 及 HOMO-IR 始终与 chemerin 独立相关。血清 chemerin 水平与肾周脂肪 chemerin 蛋白表达量呈正相关 ( $r=0.79, P<0.05$ )。结论 西格列汀可降低血清、肾周脂肪及肝脏组织中 chemerin 水平, 改善血清学各代谢指标, chemerin 可能参与 T2DM 的发生发展。

**关键词** 2 型糖尿病; 西格列汀; chemerin

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0294-04

目前糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的患病率日益增高, 预计到 2030 年 DM 患者数量在全球范围内可达 4.4 亿<sup>[1]</sup>。越来越多的研究<sup>[2]</sup>将 2 型糖尿病

(type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的发生发展归结为脂肪相关信号分子 (如瘦素、脂联素、肿瘤坏死因子等) 的分泌及局部炎症反应, chemerin 就是一种 2007 年首次被定义为由 3T3-L1 脂肪细胞分泌的新的脂肪因子, 目前 chemerin 在 T2DM 大鼠体内的变化尚无明确结论, 而且新型降糖药物西格列汀对脂肪因子 chemerin 的影响目前鲜有报道。该研究通过建立 T2DM 模型来研究脂肪因子 chemerin 在此过程中发挥的作用, 及新型降糖药物西格列汀是否通过影响 chemerin 水平来发挥其作用, 并探讨其可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** Roche Modular 全自动生化分析仪 (瑞士罗氏公司), 稳豪血糖仪 (美国强生公司), 胰岛素放免试剂盒 (北京原子高科公司), ELISA 试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司), 10% 水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司), 羟甲基淀粉酶 (上海蒙究实业有限公司), chemerin 小鼠抗大鼠单克隆抗体、辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗 (英国 Abcam 公司), ECL 化学发光显影剂 (美国 millipore 公司) 等。

**1.2 实验动物** 普通级 SD 大鼠 35 只, 雄性 4 周龄 ( $100 \pm 20$ ) g, 购自安徽医科大学实验动物中心。饲养条件为室温 ( $22 \pm 2$ ) °C, 湿度 55% 左右, 自然昼夜节律, 自由饮水摄食。适应性喂养 1 周后随机分为两组: 普通饲料组 (NC 组  $n=10$ ) 和高脂饲料组 (HF 组  $n=25$ )。NC 组予以普通饲料 (由安徽医科大学实验动物中心配制) 喂养, 直至实验结束; HF 组给予高脂饲料喂养。12 周后, 将 HF 组的大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素 (临用前溶解在 pH=4.5 的 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液中) 35 mg/kg, 于注射后第 7 天内眦静脉取血测大鼠血糖, 将空腹血糖 > 11.1 mmol/L 者定为 T2DM 模型造模成功<sup>[3]</sup>, 死亡 5 只, 造模成功 20 只。

**1.3 干预方式** 将 20 只 T2DM 大鼠随机分为两组: ① T2DM 对照组 (T2DM 组  $n=10$ ): 灌胃给予 2 ml 生理盐水作为空白对照; ② 西格列汀干预组 (SP 组  $n=10$ ): 灌胃给予磷酸西格列汀 10 mg/(kg·d), 溶于 2 ml 羟甲基淀粉酶中, 每日灌胃时间于早

2014-11-13 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); 安徽医科大学第一附属医院 2001 年度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: 刘炯炯, 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;

胡红琳, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hhl1994@sina.com

9点 持续6周 继续予以普通饲料喂养。

**1.4 标本收集与处理** T2DM模型造模成功后,所有大鼠禁食12h,内眦静脉取血2ml,干预6周后,所有大鼠禁食12h 称重,10%水合氯醛0.3ml/100g腹腔注射,麻醉状态下解剖大鼠,腹主动脉取血3ml,血标本静置15min后,3200r/min离心10min,留取血清置于-80℃冰箱保存。并在冰上操作取出肾周脂肪、肝脏组织及股侧肌肉组织,置于液氮罐中以备提取蛋白质。

**1.5 指标测定** 通过测定血清 chemerin、体重(body weight, BW)、空腹血糖(fasting glucose, FBG)、胰岛素(fasting insulin, FINS)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),计算胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, HOMO-IR) [ $HOMO-IR = FINS(IU/ml) \times FBG(mmol/L) / 22.5$ ]和胰岛β细胞功能指数(HOMO-β) [ $HOMO-β = 20 \times FINS / (FBG-3.5)$ ]来明确西格列汀对各血清代谢指标的影响。

**1.6 Western blot 法检测组织中 chemerin 蛋白表达** 提取肾周脂肪中的总蛋白,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, chemerin 小鼠抗大鼠单克隆抗体(1:1000) 4℃孵育过夜后,辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗(1:4000) 室温下孵育2h。充分洗涤后ECL化学发光显影并进行胶片显影定影处理。采用上述相同方法,在相同条件下完成肝脏组织及肌肉组织 chemerin 及各对应的β-actin 蛋白检测。图像扫描并分析各条带的灰度值。

**1.7 统计学处理** 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)及LSD法,两样本均数比较采用t检验,相关性分析采用Pearson相关性分析及多元线性回归分析,按 $\alpha = 0.05$ 检验标准。

## 2 结果

**2.1 干预前各组生化指标的比较** 与NC组相比,T2DM组与SP组大鼠的BW、FBG、FINS、TC、TG、LDL及HOMO-IR升高,HOMO-β降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );而T2DM组与SP组比较差异无统计学意义。见表1。

**2.2 干预后各组生化指标的比较** 与T2DM组相比,SP组的FBG、FINS、TC、TG、LDL及HOMO-IR均降低,HOMO-β水平升高,差异有统计学意义( $P <$

表1 西格列汀干预前各生化指标的比较( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

指标	NC组	T2DM组	SP组	F值
BW(g)	339.70 ± 46.88	382.56 ± 30.51*	379.70 ± 44.49*	2.37
FBG (mmol/L)	5.39 ± 0.84	12.74 ± 0.98*	12.44 ± 2.28*	75.60
FINS (IU/ml)	7.10 ± 0.84	14.88 ± 2.66*	14.65 ± 1.60*	56.82
TC (mmol/L)	1.78 ± 0.59	2.71 ± 0.48*	2.82 ± 0.62*	10.16
TG (mmol/L)	0.43 ± 0.07	1.43 ± 0.44*	1.43 ± 0.50*	22.23
LDL (mmol/L)	0.92 ± 0.30	2.21 ± 0.27*	2.28 ± 0.73*	25.45
HOMO-β	88.40 ± 36.22	32.52 ± 6.60*	34.57 ± 7.39*	21.37
HOMO-IR	1.70 ± 0.34	8.43 ± 1.63*	8.09 ± 1.67*	77.70

与NC组比较: \* $P < 0.05$

0.05);与NC组比较,T2DM组与SP组的FBG、FINS、TC、LDL及HOMO-IR均增高( $P < 0.05$ ),BW、HOMO-β水平均降低( $P < 0.05$ ),T2DM组的TG增高( $P < 0.05$ ),但SP组的TG变化差异无统计学意义。见表2。

表2 西格列汀干预后各生化指标比较( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

指标	NC组	T2DM组	SP组	F值
BW(g)	388.55 ± 39.03	341.50 ± 33.07#	316.80 ± 49.88#	7.79
FBG (mmol/L)	5.00 ± 0.84	13.36 ± 2.07#	8.09 ± 1.12* #	93.62
FINS (IU/ml)	6.45 ± 0.74	14.87 ± 2.92#	10.02 ± 0.37* #	64.22
TC (mmol/L)	1.70 ± 0.66	2.76 ± 0.39#	2.07 ± 0.58* #	46.63
TG (mmol/L)	0.50 ± 0.15	1.51 ± 0.30#	0.55 ± 0.03* #	58.16
LDL (mmol/L)	0.90 ± 0.25	2.22 ± 0.26#	1.37 ± 0.46* #	9.31
HOMO-β	90.21 ± 18.75	31.08 ± 8.11#	46.54 ± 13.71* #	84.27
HOMO-IR	1.44 ± 0.24	8.88 ± 2.55#	3.61 ± 0.54* #	39.44

与T2DM组比较: \* $P < 0.05$ ;与NC组比较: # $P < 0.05$

**2.3 干预前后血清 chemerin 的比较** 与NC组相比,干预前后T2DM组与SP组血清 chemerin 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );干预后与T2DM组相比,SP组血清 chemerin 水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),同时在SP组组内干预后 chemerin 水平明显低于干预前,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 西格列汀干预前后 chemerin 水平的比较( $pg/ml, n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别	干预前	干预后
NC	463.60 ± 39.46	493.34 ± 42.65
T2DM	587.46 ± 79.87*	594.80 ± 73.59*
SP	592.05 ± 110.39*	505.48 ± 41.79* #▲

与NC组比较: \* $P < 0.05$ ;与干预后T2DM组比较: # $P < 0.05$ ;与SP组干预前比较: ▲ $P < 0.05$

**2.4 肾周脂肪、肝脏组织及肌肉组织中 chemerin 蛋白的表达** T2DM组与SP组大鼠肾周脂肪、肝脏及肌肉组织的 chemerin 蛋白表达量较NC组对应组织的表达量增加( $P < 0.05$ ),在肾周脂肪及肝脏中

表达量最高,但差异无统计学意义;SP组大鼠肾周脂肪、肝脏组织的 chemerin 蛋白表达量较 T2DM 组对应组织的表达量减少( $P < 0.05$ ),与 NC 组相比差异无统计学意义,肌肉组织中 chemerin 的表达量与 T2DM 相比差异无统计学意义,见图 1、表 4。

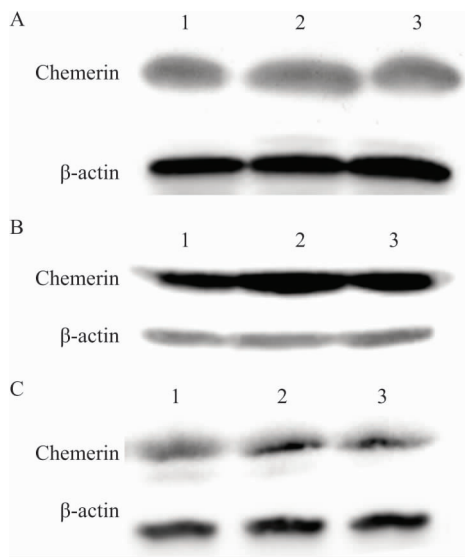


图1 肾周脂肪、肝脏组织、肌肉组织 chemerin 蛋白表达水平的比较  
A: 肾周脂肪; B: 肝脏组织; C: 肌肉组织; 1: NC 组; 2: T2DM 组; 3: SP 组

表4 西格列汀对肾周脂肪、肝脏及肌肉组织中 chemerin 蛋白表达的影响

组别	肾周脂肪	肝脏组织	肌肉组织
NC	1.67 ± 0.21	2.61 ± 0.27	0.77 ± 0.05
T2DM	3.91 ± 0.38 <sup>▲</sup>	3.48 ± 0.15 <sup>▲</sup>	0.89 ± 0.28 <sup>▲</sup>
SP	1.80 ± 0.39 <sup>▲*</sup>	2.24 ± 0.19 <sup>▲*</sup>	0.83 ± 0.02 <sup>▲</sup>

与 NC 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与 T2DM 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$

**2.5 chemerin 与各生化指标的相关性分析** 干预前血清 chemerin 与 BW、FBG、FINS、HOMO-1R、TG、TC 及 LDL 呈正相关,干预后血清 chemerin 与 BW、FINS、TG 及 HOMO-1R 呈正相关,见表 5。进一步进行多元线性回归分析,干预前以 chemerin 为因变量,以上述与 chemerin 有相关性的 BW、FBG、FINS、HOMO-1R、TG、TC 及 LDL 为自变量,结果显示 BW、TG、FINS 及 HOMO-1R ( $R^2 = 0.604, P < 0.05$ ) 可进入回归方程,干预后以 chemerin 为因变量,以上述与 chemerin 有相关性的 BW、FIN、TG 及 HOMO-1R 为自变量,结果显示 TG、FINS、HOMO-1R ( $R^2 = 0.375, P < 0.05$ ) 可进入回归方程,提示干预前后 TG、FINS、HOMO-1R 是 chemerin 的主要影响因素。相关性分析得出血清中 chemerin 的表达量与肾周

脂肪中该蛋白的表达量呈正相关( $r = 0.79, P < 0.05$ )。

表5 西格列汀干预前后 chemerin 与各生化指标相关性

指标	干预前 chemerin		干预后 chemerin	
	r 值	P 值	r 值	P 值
BW	0.800	0.040	0.891	0.010
FBG	0.668	0.035	0.596	0.069
FINS	0.640	0.036	0.693	0.026
TC	0.644	0.048	0.324	0.360
TG	0.762	0.010	0.880	0.001
LDL	0.636	0.046	0.182	0.615
HOMO-β	-0.253	0.481	-0.377	0.283
HOMO-1R	0.931	0.001	0.715	0.020

### 3 讨论

在 T2DM 这种以胰岛素抵抗为主伴有胰岛素分泌相对不足的内环境下,大鼠的胰岛 β 细胞功能显著降低,伴随血脂及体内脂肪因子 chemerin 指标的异常,本研究相关性分析得出 T2DM 组在西格列汀干预前 chemerin 水平与 BW、TG 呈独立相关,说明大鼠脂肪细胞数量和体积的增加及伴随而来的甘油三酯异常可能是血清 chemerin 水平升高的原因;另一方面血清 chemerin 水平与 FINS 及 HOMO-1R 呈独立相关,多项研究<sup>[4]</sup>证实 chemerin 与胰岛素抵抗密切相关,如在敲除小鼠 chemerin 基因后,与野生型小鼠相比,脂肪组织和肝脏胰岛素敏感性降低,肝糖输出增加, GLUT2 表达的减少,但也有研究<sup>[5]</sup>表明 chemerin 可抑制骨骼肌细胞摄取葡萄糖,降低胰岛素敏感性,诱导细胞产生胰岛素抵抗,结合本实验结果分析, T2DM 大鼠血清中 FBG、FINS 水平的升高与胰岛素抵抗程度增加是刺激 chemerin 分泌的重要因素。

根据 Western blot 结果,提示血清中升高的 chemerin 蛋白可能来源于 T2DM 大鼠的肌肉、肝脏及脂肪组织,但其中肾周脂肪中蛋白增加的程度要明显大于其余两组织,且血清中 chemerin 水平只与肾周脂肪蛋白表达量呈正相关,所以血清中升高的 chemerin 的主要来源于脂肪组织。

西格列汀作为 DPP-4 抑制剂,可以选择性的抑制 DPP-4 的生物活性,延迟 GLP-1 的降解,发挥降低血糖、促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、保护胰岛 β 细胞功能、促进 β 细胞再生等作用<sup>[6]</sup>。除上述作用外,本研究显示西格列汀干预 6 周后还可改善 T2DM 大鼠高血脂状态、炎症状态及胰岛素抵

抗程度,并且不增加大鼠的体重。

根据相关分析显示在西格列汀干预后 chemerin 与大鼠的 TG、FINS、HOMO-IR 成独立相关,这与 Derosa et al<sup>[7]</sup>的研究结果相一致,该实验结果显示联合使用西格列汀的 T2DM 患者血清 chemerin 水平、FBG、FINS 及 HOMO-IR 均低于单用二甲双胍组,说明西格列汀可能通过改善胰岛素抵抗和高胰岛素血症来影响 chemerin 水平。进一步进行 Western blot 分析,结果显示西格列汀干预后脂肪及肝脏组织中的 chemerin 表达量降低,提示西格列汀可能通过促进肝脏及脂肪组织细胞胰岛素的信号传递通路中胰岛素受体底物-1(IRS-1)的酪氨酸磷酸化,直接或间接改善胰岛素受体或受体后信号传导途径来增加胰岛素的敏感性,从而影响血清中 chemerin 水平。另一方面肠道及胰腺分泌的 GLP-1、胰岛素和胰高血糖素可以影响 TG 的水平<sup>[8]</sup>,而西格列汀可以通过提高 GLP-1 降低胰高血糖素,降低肝脏及肠道内载 TG 脂蛋白的水平来影响 TG 水平<sup>[9]</sup>,说明西格列汀能通过调节脂代谢进而影响 chemerin 的水平。

#### 参考文献

[1] Chen L, Magliano D J, Zimmet P Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives [J]. Nat

Rev Endocrinol 2012 8(4): 228–36.

- [2] Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk [J]. Acta Physiol (Oxf) 2014 210(4): 733–53.
- [3] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research [J]. J Ethnopharmacol 2008 115(2): 163–72.
- [4] Takahashi M, Okimura Y, Lguchi G, et al. Chemerin regulates beta-cell function in mice [J]. Sci Rep 2011 1: 123.
- [5] Sell H, Laurencikienien J, Taube A, et al. Chemerin is a novel adipocyte derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells [J]. Diabetes 2009 58(12): 2731–40.
- [6] Gallwitz B. Review of sitagliptin phosphate a novel treatment for type 2 diabetes [J]. Vasc Health Risk Manag 2007 3(2): 203–10.
- [7] Derosa G, Carbone A, D'Angelo A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating sitagliptin action on insulin resistance parameters and b-cell function [J]. Expert Opin Pharmacother 2012 13(17): 2433–42.
- [8] Xiao C, Pavlic M, Szeto L, et al. Effects of acute hyperglucagonemia on hepatic and intestinal lipoprotein production and clearance in healthy humans [J]. Diabetes 2011 60(2): 383–90.
- [9] Xiao C, Dash S, Morgantini C, et al. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, acutely inhibits intestinal lipoprotein particle secretion in healthy humans [J]. Diabetes 2014 63(7): 2394–401.

## The influence of sitagliptin on chemerin levels of type 2 diabetic rats

Liu Jiongjiang, Wang Changjiang, Hu Honglin, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the effects of sitagliptin on metabolic parameters and chemerin levels of type 2 diabetic rats, and to explore the relationship between chemerin and type 2 diabetes. **Methods** A total of 35 male SD rats were randomly divided into normal diet group (NC,  $n = 10$ ) and a high-fat diet group (HF,  $n = 25$ ). After 12 weeks, high-fat diet rats were given an injection of 35 mg/kg streptozotocin at a time, then the diabetic model rats ( $n = 20$ ) were randomly divided into 2 groups: diabetes control group (T2DM,  $n = 10$ ) and sitagliptin intervention group (SP,  $n = 10$ ). The rats' metabolic parameters were measured by ELISA. The chemerin protein expression levels in kidney adipose, liver and muscle tissue were detected by Western blot. **Results** ① The serum chemerin, FBG, FINS, TCH, TG, LDL, HOMO-IR levels of diabetic model group were increased. HOMO-beta decreased. Chemerin expression levels of diabetes control group in adipose, liver and muscle tissue increased compared with NC group; ② Sitagliptin could down-regulate the levels of BW, FBG, FINS, TC, TG, LDL, HOMO-IR, serum chemerin and chemerin levels in adipose and liver tissues. On the contrary, HOMO-beta was up-regulated; ③ The correlation analysis showed that TG, FINS and HOMO-IR were always independently associated with chemerin. In tissues, serum chemerin had positive correlation with chemerin expression levels in adipose. **Conclusion** Sitagliptin can reduce the levels of chemerin in serum and tissues. It also can improve the metabolic indexes remarkably in serum. Chemerin may be a key involving element in the development of diabetes.

**Key words** type 2 diabetes; sitagliptin; chemerin