

胃旁路术对非肥胖 2 型糖尿病大鼠肝脏葡萄糖激酶表达的影响

焦雪花^{1,2}, 马向华^{1*}, 卢 珊¹, 田 婷¹, 张媛媛¹

(¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²吴江第一人民医院内分泌科, 江苏 吴江 215200)

[摘要] 目的:探讨胃旁路术对非肥胖 2 型糖尿病 GK 大鼠肝脏葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)表达的影响。方法:雄性 GK 和 Wistar 大鼠各 20 只,随机分为 GK 手术组(GO 组)、GK 假手术组(GS 组)、Wistar 手术组(WO 组)和 Wistar 假手术组(WS 组),每组 10 只。检测术前及术后第 1、4、8 周各组空腹血糖和血清胰岛素水平,术后 8 周取大鼠肝脏组织,采用 RT-PCR 检测肝脏 GCK mRNA 表达水平。结果:GO 组术后第 1 周空腹血糖已开始下降,术后第 1、4、8 周分别由术前(8.73 ± 1.30)mmol/L 下降到(6.84 ± 0.89)、(6.27 ± 0.93)、(5.86 ± 0.57)mmol/L($P < 0.05$);随访过程中,GO 组空腹血清胰岛素较术前和相应时间点 GS 组均有所升高,尚未达统计学差异($P > 0.05$);GO 组术后第 8 周肝脏 GCK mRNA 表达水平明显高于 GS 组($P < 0.05$)。结论:胃旁路术能显著改善非肥胖 2 型糖尿病大鼠的糖代谢,手术的降糖作用可能与肝脏葡萄糖激酶表达增加有关。

[关键词] 胃旁路术;2 型糖尿病;GK 大鼠;胰岛素;葡萄糖激酶

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1066-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130808

Effect of gastric bypass on glucokinase expression in non-obese type 2 diabetic rat liver

Jiao Xuehua^{1,2}, Ma Xianghua^{1*}, Lu Shan¹, Tian Ting¹, Zhang Yuanyuan¹

(¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Wujiang Hospital, Wujiang 215200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of gastric bypass on the expression of liver glucokinase (GCK) in non-obese Goto-Kakizaki (GK) type 2 diabetic rats. **Methods:** Twenty male GK rats and twenty male Wistar rats were randomly divided into four groups: GK operation group (GO group), GK sham operation group (GS group), Wistar operation group (WO group), Wistar sham operation group (WS group). There were 10 rats in each group. The fasting blood glucose and serum insulin levels were measured before operation and on the 1st, 4th and 8th week after the operation. Liver tissues were harvested 8 weeks postoperatively and reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect liver GCK mRNA expression after the operation. **Results:** The fasting blood glucose of GO group decreased as early as the 1st week after surgery, which decreased from preoperative (8.73 ± 1.30) mmol/L to (6.84 ± 0.89), (6.27 ± 0.93), (5.86 ± 0.57) mmol/L on the 1st, 4th and 8th week postoperation ($P < 0.05$). The insulin level remained consistently higher in GO group with respect to GS group, but there was no significant change during the follow-up period. On the 8th week after surgery, the liver GCK mRNA level in GO group were significantly higher than GS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gastric bypass can directly improve glucose metabolism in non-obese type 2 diabetic rats, the increased expression of liver tissue GCK mRNA might contribute to the hypoglycemic effect of the surgery.

[Key words] gastric bypass; type 2 diabetes mellitus; Goto-Kakizaki rats; insulin; glucokinase

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1066-1069]

目前全世界约有 2.85 亿的糖尿病患者,预计到 2030 年将达近 5 亿^[1],其中 2 型糖尿病患者占 90%

以上。传统的控制饮食、加强运动、口服降糖药和注射胰岛素等内科治疗方案并不能够达到满意的控制和长期治愈。减重手术为 2 型糖尿病的治疗开创了一条新的途径,也为其治愈带来希望,因此对于手术机制的研究具有重要意义。本研究选用非肥胖 2 型糖尿病 GK 大鼠为研究对象,进一步探讨胃旁路术

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科技发展基金(H201202)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xianghuama@sina.com

对 GK 大鼠肝脏葡萄糖代谢的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

10~12 周龄雄性 SPF 级 GK 和 Wistar 大鼠各 20 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。大鼠饲养于南京医科大学实验动物中心,12 h 交替光照,予高压灭菌水和 ^{60}Co 辐射灭菌颗粒饲料,除手术期和禁食期外可自由进水进食。大鼠适应环境 1 周后随机分为 4 组:GK 手术组(GO 组)、GK 假手术组(GS 组)、Wistar 手术组(WO 组)和 Wistar 假手术组(WS 组),每组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 手术建模

术前禁食 12 h,不限饮水,10%的水合氯醛(3~4 ml/kg)腹腔内注射麻醉。上腹部正中切口进腹,离断幽门,闭合十二指肠残端,距 Treiz 韧带 10 cm 处切断空肠,远端空肠与幽门端端吻合,距胃-空肠吻合口远端 15 cm 行空肠-空肠端侧吻合^[2],关腹前用庆大霉素 2 ml(96 万 U/L)冲洗腹腔。假手术组在与手术组相同的部位切断肠道,再原位端端吻合。

1.2.2 血样采集

术前及术后第 1、4、8 周测定空腹血糖和血清胰岛素水平。大鼠隔夜禁食 12 h,内眦静脉取血并即时测定空腹血糖,血样静置 30 min 后 4℃下 3 500 r/min 离心 10 min,分离血清,-80℃冰箱保存待测血清胰岛素。血糖测定采用拜耳血糖仪及配套试纸,大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒购自美国 Millipore 公司。

1.2.3 组织处理

术后第 8 周处死大鼠,按需取肝脏组织,生理盐水冲洗后放入冻存管,于液氮中保存。用 TRIzol 提取肝脏组织总 RNA,RT-PCR 检测肝脏葡萄糖激酶(glucokinase,GCK)mRNA 表达水平。RT-PCR 所需试剂购自上海皓嘉科技发展有限公司。

1.3 统计学方法

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析。使用 SPSS13.0 统计软件, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空腹血糖

GO 组与 GS 组、WO 组与 WS 组两两比较,术前血糖并无统计学差异。术后第 1 周,GO 组空腹血糖已开始下降,至术后第 8 周由术前 ($8.73 \pm$

1.30)mmol/L 下降到 (5.86 ± 0.57)mmol/L ($P < 0.05$),且明显低于相应时间点 GS 组 ($P < 0.05$)。GS、WO、WS 三组空腹血糖在实验过程中无明显改变($P > 0.05$,表 1)。

表 1 四组大鼠空腹血糖的变化

Table 1 Fasting blood glucose changes of four groups (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	术前	术后 1 周	术后 4 周	术后 8 周
GO 组	8.73 ± 1.30	$6.84 \pm 0.89^*$	$6.27 \pm 0.93^*$	$5.86 \pm 0.57^{*#}$
GS 组	8.32 ± 1.12	8.20 ± 1.23	8.24 ± 0.71	7.94 ± 0.93
WO 组	4.05 ± 0.66	4.06 ± 0.25	4.41 ± 0.57	4.43 ± 0.32
WS 组	4.18 ± 0.46	4.23 ± 0.55	4.42 ± 0.59	4.29 ± 0.21

与同组术前比较,* $P < 0.05$;与同时时间点 GS 组比较,# $P < 0.05$ 。

2.2 空腹血清胰岛素

术后第 1 周,GO 组空腹血清胰岛素开始逐渐升高,术后第 1、4、8 周分别由术前的(17.30 ± 3.24)mU/L 上升到 (19.48 ± 4.73)、(20.16 ± 5.09)、(22.35 ± 4.91)mU/L(P 均 > 0.05),且均较相应时间点 GS 组有所升高,但尚未达统计学差异(P 均 > 0.05 ,表 2)。

表 2 GK 大鼠空腹血清胰岛素的变化

Table 2 Fasting serum insulin changes in GK group (mU/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	术前	术后 1 周	术后 4 周	术后 8 周
GO 组	17.30 ± 3.24	19.48 ± 4.73	20.16 ± 5.09	22.35 ± 4.91
GS 组	16.92 ± 2.60	15.74 ± 3.21	16.83 ± 2.44	16.70 ± 4.43

2.3 肝脏 GCK mRNA 表达水平

术后第 8 周,RT-PCR 检测 4 组大鼠肝脏组织 GCK mRNA 表达水平,以大鼠 β -actin 为内参,Quantity One 软件进行灰度分析,得出 GCK mRNA 与 β -actin 的灰度比值(即 GCK mRNA 相对表达水平)。结果示 GO 组 GCK mRNA 表达水平明显高于 GS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),WO 组与 WS 组间差异无统计学意义(表 3、图 1)。

3 讨论

在众多的减重术式中,胃旁路术为肥胖外科的首选,也是目前糖尿病外科最流行的术式。除了显著持久的减重效应外,胃旁路术还可缓解或改善 2 型糖尿病相关的合并症和并发症,降低长期致病率和病死率。研究发现,胃旁路术使得全因死亡率降低了 40%,心血管病死率降低 56%,癌症病死率降低 60%,而糖尿病相关的病死率降低达 92%^[3]。胃旁路术对重度肥胖的 2 型糖尿病患者治疗效果已得到国内外广泛认可,但对轻度肥胖及非肥胖 2 型糖尿病患者,尚缺乏大型前瞻性临床随机对照研究。包括中

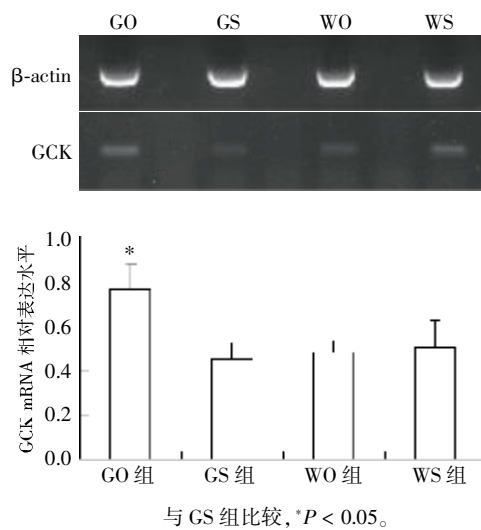


图1 术后8周大鼠肝脏GCK mRNA相对表达水平

Figure 1 Rat liver GCK mRNA expression levels after 8 weeks

国在内的亚裔人群普遍肥胖程度较轻,但在全球糖尿病患者中却占有相当大比例。因此,对胃旁路术治疗非肥胖2型糖尿病的效果及其机制的研究具有重要的意义。

GCK是葡萄糖代谢过程中的第一个限速酶,催化葡萄糖转变为6-磷酸葡萄糖,主要在肝脏和胰岛 β 细胞高表达^[4],其作为葡萄糖的感受器在维持葡萄糖稳态中起着重要作用^[5]。GCK与血糖、胰岛素之间存在一个反馈环路:当空腹或血糖浓度降低时,GCK活性降低,肝糖原输出增加以保证能量供应;而当餐后或血糖浓度升高时,GCK活性增强,胰岛素分泌增加,促进肝糖原合成,抑制肝糖异生,从而在维持血糖稳态过程中发挥重要作用。GCK基因突变可引起机体不同程度的血糖紊乱,如持续性高胰岛素血症低血糖、永久性新生儿糖尿病和成人起病的青少年糖尿病2型(MODY2)^[6]。研究发现,2型糖尿病患者存在GCK活性减低,激活GCK将有可能成为治疗2型糖尿病的一个新的靶点。

纵览文献,并无肥胖及非肥胖2型糖尿病患者GCK活性区分的报道,仅Caro等^[7]对肥胖型DM患者、糖耐量正常的肥胖个体和消瘦对照者进行了肝活检,结果DM组的肝脏GK活性较对照组下降50%。一般手术对GCK并无特异性的影响,但是术后的应激状态下,常常会影响到糖代谢关键酶的活性,例如有报道手术后GCK活性下降,除胃旁路术外,并未有手术导致GCK表达增加的报道。推测胃旁路术改善GCK活性的机制可能为:已知肝脏中GCK活性受到胰岛素的调节。胃旁路术通过旷置或重排胃肠道,改变了一系列相关胃肠激素如(GLP-

1)的分泌,从而改善了胰岛素分泌及敏感性,使得肝脏GCK活性增加。此外,胃旁路术可能通过某种未知的胃肠激素或者未知机制直接作用于肝脏细胞,改善GCK活性。

本研究发现,GO组术后第1周空腹血糖已开始下降,随访至术后第8周较术前显著降低,且低于相应时间点GS组,表明胃旁路术对非肥胖2型糖尿病大鼠亦具有良好的降糖作用,与国外众多的动物实验研究结果一致^[8-9]。术后第1周起,GO组空腹血清胰岛素已开始逐渐上升,至术后第8周较术前及相应时间点GS组均有所升高,但尚未达统计学差异。提示术后早期糖代谢的改善可能得益于胰岛素敏感性的改善,此外,胃旁路术延缓胰岛 β 细胞衰竭并促进其增生修复是一个渐进的过程,可能需要更长时间的随访观察,国外学者也有类似的报道^[10]。术后第8周,GO组肝脏组织中GCK mRNA水平显著高于GS组,而WO组与WS组间无明显差异,表明胃旁路术能增加肝脏葡萄糖激酶的表达。动物实验已证实,GCK激活剂能够使糖尿病鼠胰岛素分泌增加,肝糖原合成水平增加^[11],并显著改善口服葡萄糖耐量,减少血糖曲线下面积^[12-13]。综合文献和本研究结果,本文推测胃旁路术后肝脏葡萄糖激酶表达增加可能亦是早期糖代谢改善的机制之一。因此,GCK将有可能成为治疗2型糖尿病的一个全新的靶点,从而为2型糖尿病的预防和治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14
- [2] Rubino F, Forgione A, Cummings DE, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Ann Surg*, 2006, 244(5): 741-749
- [3] Adams TD, Gress RE, Smith SC, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(8): 753-761
- [4] Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(1): 1-6
- [5] Matschinsky FM. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus [J]. *Curr Diabetes Rep*, 2005, 5(3): 171-176
- [6] Froguel Ph, Vaxillaire M, Sun F, et al. Close linkage of glucokinase locus on 7P to early-onset non-insulin-de-

- pendent diabetes mellitus[J]. *Nature*, 1992, 356(6365): 162-164
- [7] Caro JF, Triester S, Patel VK, et al. Liver glucokinase: decreased activity in patients with type 2 diabetes [J]. *Horm Metab Res*, 1995, 27(1): 19-22
- [8] Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes; a new perspective for an old disease[J], 2004, 239(1): 1-11
- [9] Kindel TL, Yoder SM, Seeley RJ, et al. Duodenal-jejunal exclusion improves glucose tolerance in the diabetic Goto-Kakizaki rat by a GLP-1 receptor-mediated mechanism [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13(10): 1762-1772
- [10] Speck M, Cho YM, Asadi A, et al. Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from β -cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases entero- endocrine cells coexpressing GIP and GLP-1[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(5): E923-932
- [12] Futamura M, Hosaka H, Kadotani A, et al. An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(49): 37668-37674
- [12] Lino T, Tsukahara D, Kamata K, et al. Discovery of potent and orally active 3-alkoxy-5-phenoxy-N-thiazolyl benzamides as novel allosteric glucokinase activators [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(7): 2733-2743
- [13] Lino T, Hashimoto N, Sasaki K, et al. Structure-activity relationships of 3,5-disubstituted benzamides as glucokinase activators with potent in vivo efficacy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(11): 3800-3809
- [收稿日期] 2012-12-05

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 $50 \times 80 \times 100 \text{ cm}$, 或 $50 \times 80 \times 100 \text{ cm}^3$ 。

(本刊编辑: 接雅俐)