

鲨肝刺激物质对四氧嘧啶诱发的小鼠糖尿病的保护作用

洪 钢, 巫冠中*, 刘国卿

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 研究鲨肝刺激物质对四氧嘧啶诱发的小鼠糖尿病的保护作用。方法: 尾静脉注射四氧嘧啶造小鼠糖尿病模型, 观察鲨肝刺激物质对糖尿病小鼠糖代谢(空腹血糖, 糖化血红蛋白)、脂代谢(甘油三酯, 胆固醇, 游离脂肪酸)、抗氧化(超氧化物歧化酶, 丙二醛)及胰岛损伤程度的影响。结果: 鲨肝刺激物质显著降低糖尿病小鼠空腹血糖、糖化血红蛋白、甘油三酯、胆固醇、游离脂肪酸和丙二醛含量, 提高超氧化物歧化酶活性, 减轻四氧嘧啶对胰岛 β 细胞的损伤。结论: 鲨肝刺激物质对四氧嘧啶诱发的小鼠糖尿病具有显著的保护作用。

【关键词】 鲨肝刺激物质; 四氧嘧啶; 糖尿病; 保护作用

【中图分类号】 R944 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)02-0155-05

1975 年, LaBrecque 等^[1]首先从初断乳大鼠肝脏提取出一种能刺激肝细胞有丝分裂和 DNA 合成的促肝再生活性物质, 命名为肝刺激物质(hepatic stimulator substance, HSS)。国内研究人员又之称为肝刺激因子、肝细胞生长素、肝细胞裂解物等。HSS 存在于肝实质细胞胞浆, 非肝细胞中未发现, 从人、狗、猪、牛、兔、大鼠和小鼠等的新生肝和再生肝中提取才有活性, 成熟肝则无活性, 分子量 12 ~ 18 kDa, 内含约 16 种氨基酸残基(碱性氨基酸较多), 耐热(95 °C, 15 min), 耐酸碱(pH 2 ~ 9), 可被酒精沉淀而不失活性, 属非糖蛋白, 对蛋白酶(胰蛋白酶, 糜蛋白酶, 蛋白酶 K)敏感, 核糖核酸酶、神经氨酸酶及二硫键和三级结构的破坏不影响其活性。HSS 生物学活性表现为选择性作用于肝细胞(肝细胞膜上有相应的受体), 促肝细胞 DNA 合成、增殖, 参与肝细胞再生调控, 有效保护肝脏免受四氯化碳、D-半乳糖胺的进一步损伤, 抑肝纤维化, 抗肝炎病毒等, 具有显著的组织特异性, 一直是肝炎治疗、肝细胞调控的研究热点。临床用于重型肝炎、乙肝、丙肝、戊肝及肝硬化的治疗^[2-4]。目前, 国内外尚无研究 HSS 对糖尿病作用的报道。本文用鲨(体重小于 50 kg)肝提取的肝刺激物质(shark hepatic stimulator substance, sHSS)^[5], 在四氧嘧啶诱发的小鼠糖尿病实验中首次发现 sHSS 显著降低糖尿病小鼠高血糖, 并进一步研究了 sHSS 对四氧嘧啶诱

发的小鼠糖尿病的保护作用。

1 材 料

1.1 药 品

鲨肝刺激物质(sHSS), 中国药科大学生物化学教研室提供; 胰岛素(lot: 20020404), 南京新天生物化学制药有限公司; 四氧嘧啶(alloxan monohydrate, ALX), 美国 Sigma 公司产品; 2-巯代巴比妥酸(TBA), 纯度 98%, 北京欣经科生物技术公司; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT), AR, 上海试剂二厂; 葡萄糖试剂盒(lot: 20020302)、甘油三酯试剂盒(lot: 20020402)、总胆固醇试剂盒(lot: 20020103)、SOD 试剂盒(lot: 20020518)均购自南京建成生物工程研究所; 其它试剂均为市售国产分析纯。

1.2 仪 器

721 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 80-1 离心机, 上海手术器械厂; H. H. S 电热恒温水浴锅, 上海浦东跃欣科学仪器厂; 电光分析天秤, 上海第二天平仪器厂。

1.3 动 物

昆明种小白鼠, 雌雄兼用, (24 ± 2) g, 由中国药科大学动物中心提供。

2 方 法

2.1 分组与给药

98 只小鼠,雌雄各半,饲以高热量饲料^[6],按体重随机均分 7 组(14 只/组):正常对照组与模型组,给生理盐水(ip, 0.2 ml/10 g);阳性对照组,给胰岛素(ip, 6 U/kg);预防高剂量组,给 sHSS(ip, 10 mg/kg);预防低剂量组,给 sHSS(ip, 3 mg/kg);治疗高剂量组,给 sHSS(ip, 10 mg/kg);治疗低剂量组,给 sHSS(ip, 3 mg/kg)。实验过程中模型组小鼠死亡 2 只,预防低剂量组死 1 只,治疗高、低剂量组各死 1 只。

2.2 方案与造模

方案 从糖代谢、脂代谢、抗氧化及组织形态学 4 个方面探讨 sHSS 对糖尿病小鼠的保护作用,实验时间共 5 周, sHSS 给药分为预防给药和治疗给药,以显著降低血糖血脂、改善糖脂代谢的胰岛素为阳性对照药。预防给药:四氧嘧啶造模前 4 天开始给药,1 次/日,共 5 周。治疗给药:四氧嘧啶造模成功后即给药,1 次/日,共 4 周;胰岛素给药同 sHSS 治疗给药。造模后第 0, 1, 2, 3, 4 周测小鼠空腹血糖(Fasting plasma glucose, FPG),第 4 周测糖化血红蛋白(Glycohemoglobin-A1, GHbA1),总胆固醇(Cholesterol, CHOL)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA),超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD),丙二醛(Malondialdehyde, MDA)。

造模^[7] 小鼠隔夜禁食 12 h,不禁水,除正常组外均尾静脉一次性快速注入四氧嘧啶(60 mg/kg),72 h 后(禁食 10 h)眼内眦取血测 FPG, FPG>11.1 mmol/L

者(正常组、预防给药高低剂量组除外)选用。

2.3 测定方法

各组小鼠禁食过夜,于给药后 2 h 取血测各项血液生化指标。一次提取比色法^[8]测 FFA;化学比色法^[9]测 GHbA1;氰化高铁血红蛋白法^[10]测 Hb;TBA 法^[11]测 MDA;葡萄糖氧化酶法测 FPG, CHOD-PAP;终点比色法测 CHOL;甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法测 TG;黄嘌呤氧化酶法测 SOD;均按试剂盒说明操作。脱颈椎处死小鼠,钝性摘除胰腺,10%甲醛固定行病理组织学光镜检查。

2.4 数据处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用组间 *t* 检验。

3 结果

3.1 sHSS 对糖尿病小鼠糖代谢的影响

结果见表 1。sHSS 预防给药高、低剂量均显著抑制静注四氧嘧啶后小鼠血糖的升高,尤其是预防给药高剂量组,试验结束时其血糖均值接近于正常组。sHSS 治疗给药高、低剂量显著降低糖尿病小鼠的高血糖。糖化血红蛋白是血红蛋白糖基化反应的产物,结构稳定,不易降解,反映患者 1~2 月内血糖控制水平,其测定不受进食、胆红素、尿酸、肌酐等因素的影响^[12],是反映血糖长期控制情况及糖毒性的可靠指标,各组实验结果与 FPG 结果相一致,进一步表明 sHSS 具有显著的降低糖尿病小鼠高血糖的作用,改善糖尿病小鼠高血糖引起的糖代谢紊乱。

Tab 1. Effect of sHSS on glycometabolism in diabetic mice($\bar{x} \pm s$)

| Groups | Dose (mg/kg) | n | FPG (mmol/L) | | | | | GHbA ₁ (%) |
|-------------|-----------------|----|--------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 week | |
| Normal | | 14 | 8.66±1.98*** | 8.23±2.04*** | 8.45±1.76*** | 8.51±1.64*** | 8.63±2.52*** | 6.83±1.63*** |
| Model | | 12 | 37.46±9.17 | 435.24±5.13 | 33.30±5.72 | 30.29±6.75 | 26.52±4.13 | 16.25±3.31 |
| INS (6U/kg) | | 14 | 35.82±7.10 | 4.31±1.23*** | 4.56±1.19*** | 4.69±1.34*** | 5.08±0.86*** | 6.08±2.18*** |
| Pretreat | 10 | 14 | 18.10±6.41** | 17.15±3.98** | 12.29±3.38*** | 11.09±3.17*** | 9.56±2.57*** | 7.08±2.07*** |
| (sHSS) | 3 | 13 | 22.05±6.66* | 20.14±4.36* | 17.26±3.52** | 15.87±3.79** | 11.01±2.87*** | 7.85±2.41*** |
| Treat | 10 | 12 | 35.28±5.55 | 19.77±3.87*△△ | 19.03±4.32*△△ | 18.52±4.24*△△ | 14.46±2.78***△△ | 8.58±2.35** |
| (sHSS) | 33 | 12 | 34.67±8.02 | 21.61±4.64*△ | 19.56±4.17*△△ | 18.94±4.10*△△ | 15.42±3.23**△△ | 8.83±2.58** |

* *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.001 vs Model; △*P*<0.05, △△*P*<0.01, △△△*P*<0.001 vs 0 w

3.2 sHSS 对糖尿病小鼠脂代谢的影响

结果见表 2。sHSS 预防给药和治疗给药均显著降低糖尿病小鼠血液 FFA、TG 和 CHOL,尤其是

预防给药高剂量组,血脂水平降至正常组以下。试验结果表明, sHSS 的降脂作用显著。糖尿病高血脂可造成胰岛 β 细胞功能的衰竭、胰岛素抵抗的产

Tab 2 Effect of sHSS on lipometabolism in diabetic mice($\bar{x}\pm s$)

| Groups | Dose (mg/kg) | n | TG (mmol/L) | CHOL (mmol/L) | FFA (mmol/L) |
|--------------------|-----------------|----|-----------------|-----------------|----------------|
| Normal | | 14 | 0.86±0.20 * | 1.88±0.46 * | 0.76±0.15 *** |
| Model | | 12 | 1.41±0.22 | 2.61±0.62 | 1.54±0.32 |
| INS (6U/kg) | | 14 | 0.73±0.19 * | 1.87±0.33 * | 0.54±0.13 *** |
| Pretreat (sHSS) | 10 | 14 | 0.44±0.13 ***△△ | 1.15±0.30 ** △▲ | 0.51±0.12 ***△ |
| | 3 | 13 | 0.58±0.15 ** | 1.55±0.36 ** | 0.54±0.11 *** |
| Treat | 10 | 12 | 0.55±0.14 **△ | 1.68±0.45 * | 0.57±0.16 *** |
| (sHSS) | 3 | 12 | 0.66±0.18 * | 1.72±0.49 * | 0.67±0.17 *** |

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs Model; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ vs Normal; ▲ $P<0.05$ vs INS

生、组织细胞摄取利用葡萄糖的抑制^[13], sHSS 的降脂作用减轻高 FFA、TG 及 CHOL 介导的脂毒性, 改善糖尿病小鼠的脂质代谢紊乱。

3.3 sHSS 对糖尿病小鼠抗氧化能力的影响

结果见表 3。sHSS 预防给药和治疗给药均显著升高糖尿病小鼠超氧化物歧化酶活性, 降低丙二醛含量, 表明 sHSS 可显著增强小鼠的抗氧化能力。

在测定 SOD 活性时发现模型组血红蛋白含量异常升高, 显著高于其它各组, 可能是四氧嘧啶在体内经酶促或非酶促反应产生自由基引发生物大分子的破坏、加快修复系统运转、提高机体耗氧量而导致 Hb 代偿性增高^[14], 这在另一角度反映了 sHSS 预防给药和治疗给药显著抑制四氧嘧啶引起的氧化损伤。

Tab 3 Antioxidative effect of sHSS on alloxan-induced diabetes in mice($\bar{x}\pm s$)

| Groups | Dose (mg/kg) | n | SOD (Nu/ gHb) | MDA (nmol/ml) | Hb (g/dl) |
|--------------------|-----------------|----|----------------------|---------------|---------------|
| Normal | | 14 | 16016.02±3750.81 * | 1.89±0.23 *** | 13.54±1.51 * |
| Model | | 12 | 11412.15±2621.83 | 3.56±0.45 | 17.11±3.09 |
| INS (6U/kg) | | 14 | 24159.11±4160.46 *** | 2.05±0.35 ** | 11.3±2.72 ** |
| Pretreat (sHSS) | 10 | 14 | 17325.41±4083.07 ** | 2.22±0.34 *** | 11.70±2.26 ** |
| | 3 | 13 | 16115.45±4000.57 * | 2.31±0.28 ** | 12.77±2.32 * |
| Treat | 10 | 12 | 15976.97±3576.24 * | 2.24±0.35 ** | 12.62±2.28 * |
| (sHSS) | 3 | 12 | 15143.09±2990.15 * | 2.39±0.32 ** | 13.20±2.58 * |

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs Model

3.4 组织形态学检查

10% 甲醛固定胰腺, 每组选六例标本, 石蜡包埋切片, H. E 染色, 结果如图 1 所示。正常组(A)胰岛结构清晰, 边缘界限清晰整齐, 细胞分布均匀, 细胞核大小均一, 胰岛内充满均匀分布的胰岛素分泌颗粒。模型组(B)胰岛结构紊乱, 边缘不清, 细胞变性坏死, 淀粉样物质沉积, 细胞数目减少, 大部分细胞核固缩变小, 脱颗粒明显。胰岛素组(C)胰岛边缘游离, 结构不清晰, 细胞核大小不一、部分核固缩变小, 损伤程度较模型组轻, 较正常组损伤程度大。预防高剂量组(D)胰岛结构清晰, 边缘整齐, 细胞分布均匀, 胰岛内充满均匀分布的胰岛素分泌颗粒, 细胞核略有缩小, 基本接近于正常组。预防低剂量组(E)胰岛边缘不清, 细胞核明显固缩变小, 脱颗粒不明显, 病变程度轻于模型组。治疗

高剂量组(F)胰岛结构不清晰, 部分细胞核固缩, 未见其它明显病变, 损伤程度较模型组轻。治疗低剂量组(G)胰岛结构不清, 边缘界限游离不清, 细胞核固缩变小程度高, 脱颗粒明显, 未见明显变性坏死现象, 病变程度较模型组轻。组织形态学检查结果表明 sHSS 给药各组均不同程度地减轻四氧嘧啶对胰岛的选择性损伤, 其中以预防高剂量组的保护作用最明显, 胰岛损伤程度较小, 接近于正常组。

4 讨 论

四氧嘧啶在体内经酶促或非酶促反应产生超氧自由基, 与生物膜上不饱和脂肪酸作用, 产生过氧化脂质, 破坏细胞膜和亚细胞膜的结构与功能, 选择性作用于胰岛 β 细胞, 损伤细胞内 DNA^[15], β 细胞合成前胰岛素减少, 导致胰岛素缺乏, 糖、脂、

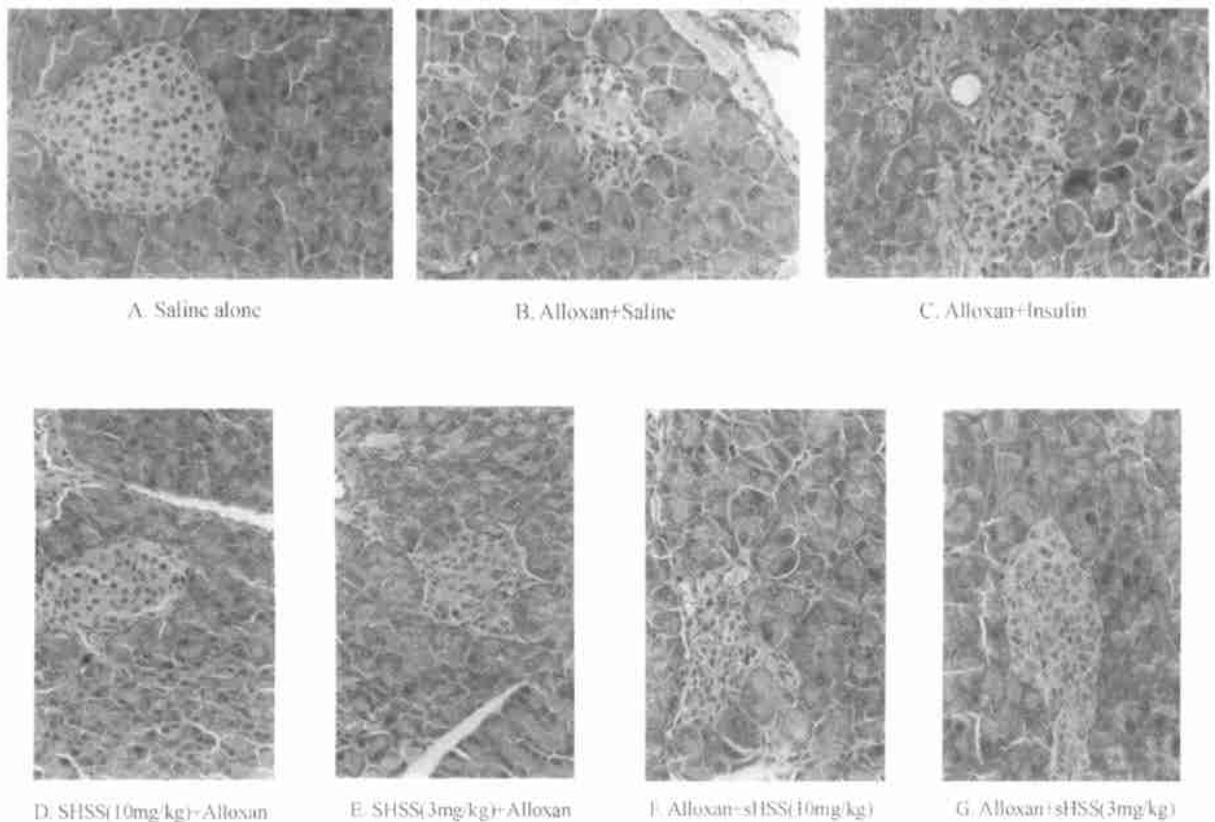


Fig 1. Islet histological findings indicate that alloxan induced islet lesions could be ameliorated by sHSS in mice

A. Saline alone($\times 200$); B. Alloxan+Saline($\times 200$); C. Alloxan+Insulin($\times 200$); D. sHSS(10 mg/kg)+Alloxan($\times 200$); E. sHSS(3 mg/kg)+Alloxan($\times 200$); F. Alloxan+sHSS(10 mg/kg)($\times 200$); G. Alloxan+sHSS(3 mg/kg)($\times 200$)

蛋白质代谢紊乱, 引发糖尿病。Kamata 等^[16] 研究指出血糖的升高可引起蛋白质糖化的增强, 糖的自身氧化与糖化蛋白质又可引起体内自由基产生增加和抗氧化能力下降, 形成恶性循环。SOD 是机体清除氧自由基的主要抗氧化酶之一, 反映机体清除自由基能力的高低。MDA 则是氧自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸反应生成的过氧化脂质的分解产物, 反映氧自由基水平及机体脂质过氧化的速率和强度^[17]。sHSS 显著降低 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 增强糖尿病小鼠清除自由基的能力, 抑制自由基损伤引起的 Hb 代偿性增高, 减轻自由基对胰岛 β 细胞的损伤, 促进胰岛 β 细胞的修复与再生, 提高胰岛素水平, 进而降低血糖, 抑制糖化蛋白的生成, 降低胰岛素缺乏所致的血脂异常升高, 改善糖尿病小鼠的糖脂代谢, 减轻糖脂毒性, 延缓胰岛 β 细胞功能衰竭^[18]。sHSS 的抗自由基氧化作用是其保护胰岛、改善糖脂代谢的机制之一, 是否通过刺激胰岛素分泌、增强胰岛素样作用, 或与 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TNF-}\beta$ 、Leptin 等因子相互作用, 或通过作用于肝细

胞的糖原合成、肌细胞糖原生成及糖酵解等途径而发挥其糖尿病保护作用尚待进一步研究。

参考文献

- [1] LaBrecque DR, Pesch LA. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulatory substance from rat liver[J]. *J Physiol* 1975, **248**: 273-278.
- [2] 宫德正(Gong DZ), 梅懋华(Mei MH). 肝刺激物质的研究进展[J]. 大连医科大学学报(*Journal of Dalian Medical University*), 1995, **17**(3): 236-239
- [3] 陈茂伟(Chen MW), 周桂英(Zhou GY). HSS 的研究进展[J]. 广西预防医学(*Guangxi Journal of Preventive Medicine*), 2000, **6**(1): 48-50.
- [4] 郭昱(Guo Y), 吴梧桐(Wu WT). 肝细胞生长因子及肝细胞刺激因子的研究概况[J]. 药学进展(*Progress in Pharmaceutical Sciences*), 2000 **24**(2): 73-76.
- [5] Wu Wutong, Guo Yu, Wang Yongtong. Preparation of shark hepatic stimulator substance (sHSS) polypeptide and its application in liver disease prevention and treatment. 中国专利 CN 1250780 (CL. C07K14/435), 19 Apr 2000, Appl. 99, 114 463, 28 sep 1999; 12pp (ch.)
- [6] Luo J, Quan J, Tsai J, et al. Nongenetic mouse model of non-insulin-

- dependent diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 1998, 47: 663-667.
- [7] 张均田(Zhang JT). 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 981-982
- [8] 李影林(Li YL). 中华医学检验全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 739-740.
- [9] 叶应妩(Ye YW), 李健斋(Li JZ), 王玉琛(Wang YC). 临床实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 811-812
- [10] 叶应妩(Ye YW), 李健斋(Li JZ), 王玉琛(Wang YC). 临床实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 967
- [11] 张均田(Zhang JT). 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 1012-1013.
- [12] 张秀明(Zhang XM), 李健斋(Li JZ), 魏明竟(Wei MJ)等. 现代临床生化检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 110-111.
- [13] 黄燕飞(Huang YF), 刘志红(Liu ZH). 脂毒性与 2 型糖尿病及其并发症的关系[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志(*J Nephrol Dialy Transplant*), 2002, 11(1): 58-63.
- [14] 杨建雄(Yang JX), 田京伟(Tian JW), 李发荣(Li FR). 太白参对小鼠抗氧化能力的影响[J]. 西北药学杂志(*J Northwest Pharmacology*), 2001, 16(5): 209-211.
- [15] Asayama K, Nyfeler F, Eenglish D, et al. Alloxan-induced free radical production in isolated cells: selective effect on islets cells[J]. *Diabetes*, 1984, 33(10): 1008-1011
- [16] Kamata K, Nakajima M, Sugiura M. Effects of superoxide dismutase on the acetylcholine-induced relaxation response in cholesterol-fed and streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *J Smooth Muscle Res*, 1999, 35(2): 33-46.
- [17] 金 晖(Jin H), 唐 尧(Tang Y). 糖尿病中的氧化与抗氧化损伤[J]. 医学综述(*Journal of Medical Science Overview*), 1996, 2(2): 49-51.
- [18] 杨文英(Yang WY). 2 型糖尿病, 一种糖脂代谢病?! [J]. 国外医学内分泌学分册(*J Abroad Medical Science, Endocrine Volume*), 2001, 21(6): 284-286.

Protective Effects of Shark Hepatic Stimulator Substance on Alloxan-induced Diabetes in Mice

HONG Gang, WU Guan-Zhong, LIU Guo-Qing

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【ABSTRACT】 AIM: To study the protective effects of Shark Hepatic Stimulator Substance (sHSS) on alloxan-induced diabetes in mice. **METHOD:** An experimental diabetes model was produced by intravenous injection of alloxan. The effects of sHSS on diabetes mice were investigated by observing the change of glycometabolic index (fasting plasma glucose, glycohemoglobin-A₁), lipometabolic index (triglyceride, cholesterol, free fatty acid), antioxidative index (superoxide dismutase, malondialdehyde) and the injured degree of β cell in pancreatic islet. **RESULT:** sHSS markedly decreased the level of fasting plasma glucose, glycohemoglobin-A₁, triglyceride, cholesterol, free fatty acid and malondialdehyde, increased the activity of superoxide dismutase and attenuated the injured degree of β cell in pancreatic islet. **CONCLUSION:** sHSS has a significantly protective effect on alloxan-induced diabetes in mice.

【KEY WORDS】 Shark Hepatic Stimulator Substance; Alloxan; Diabetes; Protective effect