

## 褪黑素抑制糖尿病大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能

夏 凌<sup>1</sup>, 张春阳<sup>2</sup>, 刘志民<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003; 2. 同济大学附属同济医院内分泌科, 上海 200065)

**[摘要]** **目的:**观察抗氧化剂褪黑素对糖尿病大鼠氧化应激指标及下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的影响,探讨褪黑素对糖尿病大鼠保护作用的可能机制。**方法:**雄性SD大鼠随机分为正常对照组( $n=6$ )、糖尿病组(DM, $n=7$ )、糖尿病褪黑素治疗1组(DM+Mel1, $n=6$ )和糖尿病褪黑素治疗2组(DM+Mel2, $n=6$ )。腹腔注射链脲佐菌素(65 mg/kg)制备糖尿病大鼠模型,DM+Mel1组给予10 mg/kg褪黑素灌胃,DM+Mel2组给予0.2 mg/kg褪黑素灌胃,正常对照组和DM组每天灌胃等体积的2%乙醇溶液。12周后检测各组大鼠血糖、体质量、双侧肾上腺质量/体质量值,比色法检测血丙二醛(MDA)含量,酶学法检测血总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)含量,放射免疫法检测血促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)含量。**结果:**与正常对照组相比,DM组大鼠血糖水平、双侧肾上腺质量/体质量、MDA、TC、TG、CRH、ACTH、CORT水平显著升高( $P<0.01$ ),体质量明显减轻( $P<0.01$ );与DM组相比,DM+Mel1组和DM+Mel2组大鼠血糖、双侧肾上腺质量/体质量、MDA、TC、TG显著降低( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),体质量明显升高( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),DM+Mel1组大鼠血CRH、ACTH、CORT水平显著降低( $P<0.01$ ),DM+Mel2组大鼠血CORT水平显著降低( $P<0.05$ ),DM+Mel2组大鼠血CRH、ACTH水平没有明显改变。**结论:**褪黑素可以降低糖尿病大鼠氧化应激水平,改善糖、脂肪代谢紊乱,抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴功能,对实验性糖尿病具有保护作用。

**[关键词]** 褪黑素;糖尿病,实验性;下丘脑-垂体-肾上腺轴**[中图分类号]** R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1184-04

## Melatonin inhibits the regulation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in diabetic rats

XIA Ling<sup>1</sup>, ZHANG Chun-yang<sup>2</sup>, LIU Zhi-min<sup>1\*</sup> (1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Endocrinology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effect of melatonin (Mel), a potent antioxidant, on the oxidative stress and the activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in diabetic rats. **Methods:** Male SD rats were assigned to the following 4 groups: normal control (treated with 2% ethyl alcohol lavage [NC,  $n=6$ ]), diabetes mellitus control (treated with 2% ethyl alcohol lavage [DM,  $n=7$ ]), diabetes mellitus model group 1 (treated with Mel lavage [10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, DM+Mel1,  $n=6$ ]), diabetes mellitus model group 2 (treated with Mel lavage [0.2 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, DM+Mel2,  $n=6$ ]). Diabetes in DM group, DM+Mel1 group and DM+Mel2 group was induced by intraperitoneal injection of streptozotacin (65 mg/kg). Blood glucose, body weight and adrenal gland weight/body weight (AW/BW) were determined in the 4 groups 12 weeks later; malondialdehyde (MDA) was examined with visible spectrophotometry; blood total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were examined with enzymology method; blood corticotrophin-releasing hormone (CRH), adreno-corticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) were examined with radioimmune method. **Results:** Blood glucose, MDA, TC, TG, CRH, ACTH, CORT and AW/BW in DM group were significantly higher than those in NC group ( $P<0.01$ ); and the body weight of rats in DM group were significantly lower than those of NC group ( $P<0.01$ ). Compared with DM group, DM+Mel1 and DM+Mel2 group had a significantly lower blood glucose, MDA, TC, TG and AW/BW ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ) and higher body weight ( $P<0.01$ ). Blood CRH, ACTH and CORT were markedly decreased in DM+Mel1 group ( $P<0.01$ ); blood CORT were markedly decreased in DM+Mel2 group ( $P<0.05$ ); blood CRH and ACTH in DM+Mel2 group had no significant changes. **Conclusion:** Mel may lower the oxidase activity, improve metabolic disorder of glucose and fat, and inhibit the activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in diabetic rats, exerting protective effect on diabetic rats.

**[KEY WORDS]** melatonin; diabetes mellitus, experimental; hypothalamo-pituitary-adrenal axis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1184-1187]

既往研究<sup>[1-2]</sup>表明,糖尿病长期高血糖状态下,机体下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴和交感-肾上腺髓质轴过度激活,升糖激素水平增加,进一步加重高糖损伤。近年来,氧化应激在糖尿病慢性并发症发生、发

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(“973”计划)(2005CB523304). Supported by National Program on Key Basic Research Projects(973 Program) (2005CB523304).

**[作者简介]** 夏 凌, 硕士生. E-mail: med\_xling@163.com

\* Corresponding author. E-mail: LZM@sh163.net

展中的作用日益受到重视。动物实验<sup>[3]</sup>表明抗氧化剂可以降低氧化应激水平,改善糖、蛋白质、脂肪代谢紊乱,对实验性糖尿病具有保护作用。但抗氧化剂对糖尿病下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响研究不多,且结果并不一致。褪黑素(Mel)是松果体分泌的强抗氧化剂,研究表明褪黑素可以降低应激时血皮质酮浓度<sup>[4]</sup>,减弱下丘脑-垂体-肾上腺轴对应激的应答<sup>[5]</sup>,但其作用机制仍不清楚。本研究拟观察褪黑素对糖尿病大鼠氧化应激指标及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响,以进一步探讨褪黑素对糖尿病大鼠代谢紊乱保护作用的可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 褪黑素、链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)放射免疫试剂盒、促肾上腺皮质激素(ACTH)放射免疫试剂盒由第二军医大学基础部神经生物学教研室提供,皮质酮(CORT)放射免疫试剂盒购自美国 DSL 公司,丙二醛(MDA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)测定试剂盒购自南京建成公司。血糖测定仪购自罗氏公司。

1.2 动物分组及处理 雄性 SD 大鼠 30 只,体重 140~170 g,由上海中国科学院实验动物中心提供。大鼠适应性饲养 5 d 后按随机数字表法分为 4 组:正常对照组 6 只,糖尿病组(DM)、糖尿病褪黑素治疗 1 组(DM+Mel1)、糖尿病褪黑素治疗 2 组(DM+Mel2)各 8 只。后 3 组大鼠一次性给予 STZ (65 mg/kg)腹腔注射[STZ 用前以 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)新鲜配制],1 周后尾静脉采血测血糖,以血糖大于 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型。褪黑素用前溶于 2% 乙醇溶液中,DM+Mel1 组每天灌胃 10 mg/kg 褪黑素,DM+Mel2 组每天灌胃 0.2 mg/kg 褪黑素,正常对照组和 DM 组每天

灌胃等体积的 2% 乙醇溶液。所有大鼠自由饮水,给予正常大鼠饲料,每周测量体质量和血糖。

持续给药 12 周后测大鼠血糖、体质量,上午 8:00~10:00 空腹麻醉下腹主动脉留取血标本,用于检测血 MDA、TC、TG、CRH、ACTH、CORT 水平,迅速取出肾上腺,称双侧肾上腺质量,计算双侧肾上腺质量/体质量。

1.3 血 MDA 含量的测定 按照 MDA 试剂盒说明书操作,用比色法测定。

1.4 血 TC、TG 含量的测定 按照 TC、TG 试剂盒说明书操作,用酶学法测定。

1.5 血 CRH、ACTH、CORT 含量的测定 CRH、ACTH 采血管中预先加入 0.3 mmol/L 己二胺四乙酸二钠溶液(每毫升全血 20  $\mu$ l)和抑肽酶(每毫升全血 500 U),预冷准确采集全血 4 ml,轻缓混匀,迅速在低温(4℃)下离心,取血浆低温保存。CORT 采血管中预先不加抗凝剂,预冷准确采集全血 1 ml,低温(4℃)离心,取血清低温保存。检测步骤严格按照 CRH、ACTH、CORT 试剂盒说明书操作。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间数据差异显著性均采用 *t* 检验处理。

## 2 结果

2.1 糖尿病模型的制备情况 24 只大鼠制备糖尿病模型,成模 19 只,19 只大鼠至实验结束全部存活。与正常对照组相比,DM 组、DM+Mel1 组和 DM+Mel2 组大鼠血糖水平显著升高( $P < 0.01$ ),体质量明显减轻( $P < 0.01$ ),DM 组双侧肾上腺质量/体质量显著升高( $P < 0.01$ );与 DM 组相比,DM+Mel1 组和 DM+Mel2 组大鼠血糖水平、双侧肾上腺质量/体质量显著降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),体质量明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血糖、体质量、双侧肾上腺质量/体质量检测结果

Tab 1 Blood glucose, body weight, and AW/BW in rats of different groups

| Group          | <i>n</i> | Blood glucose<br>( $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | Body weight<br>( <i>m/g</i> )     | AW/BW<br>( $\times 10^{-4}$ )  |
|----------------|----------|--|-----------------------------------|--------------------------------|
| Normal control | 6        | 5.7 $\pm$ 0.7  | 541.3 $\pm$ 37.7                  | 1.26 $\pm$ 0.34                |
| DM             | 7        | 30.0 $\pm$ 3.0**   | 339.6 $\pm$ 41.0**                | 2.04 $\pm$ 0.36**              |
| DM+Mel1        | 6        | 22.3 $\pm$ 3.2** $\Delta\Delta$                            | 455.3 $\pm$ 19.3** $\Delta\Delta$ | 1.32 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$ |
| DM+Mel2        | 6        | 25.4 $\pm$ 3.7** $\Delta\Delta$                            | 382.3 $\pm$ 22.5** $\Delta$       | 1.58 $\pm$ 0.40 $\Delta$       |

AW: Adrenal gland weight; BW: Body weight. \*\*  $P < 0.01$  vs normal control group;  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs DM group

2.2 血 MDA、TC、TG 检测结果 与正常对照组

相比,DM 组大鼠血 MDA、TC、TG 水平显著升高

( $P < 0.01$ ); 与 DM 组相比, DM+Mel1 组和 DM+Mel2 组大鼠血 MDA、TC、TG 水平显著降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠血丙二醛、三酰甘油和总胆固醇含量的检测结果  
Tab 2 Blood MDA, TC, and TG contents in rats of different groups

( $\bar{x} \pm s, c_B / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

| Group          | n | MDA                | TC                       | TG                       |
|----------------|---|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal control | 6 | 5.33±2.00          | 1.36±0.27                | 2.10±0.61                |
| DM             | 7 | 15.06±5.09**       | 2.65±0.60**              | 5.60±2.10**              |
| DM+Mel1        | 6 | 8.58±4.31 $\Delta$ | 1.57±0.45 $\Delta\Delta$ | 2.83±0.90 $\Delta\Delta$ |
| DM+Mel2        | 6 | 8.82±4.43 $\Delta$ | 1.92±0.47* $\Delta$      | 3.16±1.04 $\Delta\Delta$ |

MDA: Malondialdehyde; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal control group;  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs DM group

2.3 血 CRH、ACTH、CORT 检测结果 与正常对照组相比, DM 组、DM+Mel2 组大鼠血 CRH、ACTH、CORT 水平显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 与 DM 组相比, DM+Mel1 组大鼠血 CRH、

ACTH、CORT 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), DM+Mel2 组大鼠血 CORT 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), DM+Mel2 组大鼠血 CRH、ACTH 水平没有明显改变。见表 3。

表 3 各组大鼠血促肾上腺皮质激素释放激素、促肾上腺皮质激素、皮质酮含量检测结果  
Tab 3 Blood CRH, ACTH, and CORT contents in rats of different groups

( $\bar{x} \pm s, p_B / \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

| Group          | n | CRH                       | ACTH                        | CORT                         |
|----------------|---|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Normal control | 6 | 12.83±3.43                | 189.60±64.82                | 518.01±195.11                |
| DM             | 7 | 31.52±7.33**              | 359.56±71.92**              | 1300.27±282.86**             |
| DM+Mel1        | 6 | 19.19±5.38 $\Delta\Delta$ | 208.93±76.33 $\Delta\Delta$ | 680.55±220.05 $\Delta\Delta$ |
| DM+Mel2        | 6 | 26.03±5.55**              | 278.62±67.63*               | 882.79±329.03* $\Delta$      |

CRH: Corticotrophin-releasing hormone; ACTH: Adreno-corticotrophic hormone; CORT: Corticosterone. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal control group;  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs DM group

### 3 讨论

肾上腺增大作为慢性应激的标志之一得到证实<sup>[6]</sup>, 故双侧肾上腺质量/体质量可反映糖尿病大鼠的应激状态。本研究表明, 糖尿病时双侧肾上腺质量/体质量升高, 褪黑素可以明显降低双侧肾上腺质量/体质量, 提示褪黑素可以改善糖尿病大鼠的应激水平。

Ia-Fleur 等<sup>[7]</sup> 研究认为褪黑素在维持血糖内环境稳定中发挥作用。但 Yavuz 等<sup>[8]</sup> 应用外源性褪黑素腹腔注射糖尿病大鼠 4 周, 并没有发现褪黑素对糖尿病大鼠血糖有降低作用。本研究表明, 褪黑素治疗可以部分降低糖尿病大鼠血糖水平, 但不能使血糖水平恢复正常。究其原因, 可能由于本实验设计为 12 周, 周期较长, 褪黑素部分恢复了胰岛 B 细胞的分泌活性。

糖尿病时氧化应激水平升高, 本实验观察到, 糖尿病组脂质过氧化产物 MDA 水平升高, 褪黑素

治疗可以显著降低血 MDA 水平, 与既往研究<sup>[8]</sup> 结果一致。本研究还发现褪黑素可以显著降低糖尿病时升高的血总胆固醇、三酰甘油水平, 改善糖尿病时脂肪代谢紊乱。

神经、内分泌、免疫系统之间存在着复杂的相互调节。应激时感染和炎症等因素刺激免疫系统, 产生 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ -内啡肽等细胞因子, 激活下丘脑-垂体-肾上腺轴引起 CRH、AVP 释放, 进一步导致下游的 ACTH、GC 释放增加。Barriga 等<sup>[9]</sup> 体外培养吞噬细胞于药理浓度的褪黑素溶液中, 发现吞噬细胞的活性下降, 同样的结果亦在松果体切除后的动物模型中观察到。提示褪黑素与免疫系统间存在相互作用。

既往多数研究结果显示, 褪黑素对于应激状态下下丘脑-垂体-肾上腺轴具有抑制作用。Saito 等<sup>[4]</sup> 比较了新生 broilers 小鸡和对应激更易感的 layers 小鸡脑组织褪黑素浓度, 发现 broilers 组夜间脑组织中褪黑素浓度远远高于 layers 组, 进一步研究还发现褪黑

素脑室内注射可以降低 layers 组应激时升高的血皮质酮浓度。Barriga 等<sup>[10]</sup>研究了肢体制动模型鸽子血褪黑素和皮质酮浓度,发现应激时随着血皮质酮浓度的升高,血褪黑素浓度亦相应升高,认为应激时褪黑素释放增加拮抗了糖皮质激素对器官的不良作用。Sacco 等<sup>[11]</sup>给予大鼠致死剂量的脂多糖,发现血中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 水平增加,外源性的褪黑素降低了血 TNF- $\alpha$  水平,但并没有降低血皮质酮水平。

糖尿病时机体的神经、内分泌、免疫系统间的相互调节更加复杂多样。有学者观察到,糖尿病时肾上腺酪氨酸羟化酶 mRNA 水平下降,而海马盐皮质激素受体 mRNA 水平升高<sup>[2]</sup>,下丘脑室旁核和视上核 CRH mRNA 表达增加<sup>[12]</sup>。最新研究<sup>[13]</sup>发现,褪黑素受体 MT1 亚型在下丘脑和垂体广泛存在,这些发现为褪黑素参与下丘脑、垂体各种功能活动提供了神经生物学基础,MT1 受体亚型和 CRH 的共区域化提示褪黑素可能在下丘脑室旁核直接调节 HPA 轴活性。

本研究显示,褪黑素可以降低糖尿病时升高的血 CRH、ACTH 和 CORT 水平,抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴功能,但机制尚不清楚。可能的机制:褪黑素降低了应激时细胞因子的水平;部分恢复胰岛  $\beta$  细胞的分泌活性;改善糖、蛋白质、脂肪代谢紊乱;强大的抗氧化作用,减少氧自由基的生成;通过其在下丘脑和垂体广泛存在的 MT1 受体直接调节下丘脑-垂体-肾上腺轴活性等。

综上所述,本研究结果显示褪黑素降低了糖尿病大鼠血糖、血脂和 MDA 水平,抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴功能,且大剂量褪黑素效果优于小剂量褪黑素,对糖尿病时急性代谢紊乱具有保护作用。鉴于其对于神经、内分泌、免疫系统的复杂调节,抗氧化应激可能不是其保护糖尿病代谢紊乱的唯一机制,具体机制尚有待于进一步研究。

## [参考文献]

[1] Chan O, Chan S, Inouye K, et al. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment [J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 4872-4879.

- [2] Inouye K E, Chan O, Yue J T, et al. Effects of diabetes and recurrent hypoglycemia on the regulation of the sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenal axis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288: E422-E429.
- [3] Nishida S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus [J]. *Endocrine*, 2005, 27: 131-136.
- [4] Saito S, Tachibana T, Choi Y H, et al. ICV melatonin reduces acute stress responses in neonatal chicks [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 165: 197-203.
- [5] Chan O, Inouye K, Akirav E, et al. Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 1382-1390.
- [6] Zelena D, Barna I, Mlynarik M, et al. Stress symptoms induced by repeated morphine withdrawal in comparison to other chronic stress models in mice [J]. *Neuroendocrinology*, 2005, 81: 205-215.
- [7] la-Fleur S E, Kalsbeek A, Wortel J, et al. Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations [J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13: 1025-1032.
- [8] Yavuz O, Cam M, Bukan N. Protective effects of melatonin on  $\beta$ -cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats [J]. *Acta Histochem*, 2003, 105: 261-266.
- [9] Barriga C, Martin M I, Tabla R, et al. Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress [J]. *J Pineal Res*, 2001, 30: 180-187.
- [10] Barriga C, Marchena J M, Lea R W, et al. Effect of stress and dexamethasone treatment on circadian rhythms of melatonin and corticosterone in ring dove (*Streptopelia risoria*) [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 232(1-2): 27-31.
- [11] Sacco S, Aquilini L, Ghezzi P, et al. Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 343: 249-255.
- [12] Huang Q, Timofeeva E, Richard D. Corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of rats with insulin and corticosterone deficits [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37: 213-226.
- [13] Wu Y H, Zhou J N, Balesar R, et al. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 499: 897-910.

[收稿日期] 2007-05-25

[修回日期] 2007-10-09

[本文编辑] 曹 静