

褪黑素抑制糖尿病大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能

夏 凌¹, 张春阳², 刘志民^{1*}

(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 Ling¹, ZHANG Chun-yang², LIU Zhi-min^{1*} (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⁻¹ · d⁻¹, DM+Mel1, $n=6$]), diabetes mellitus model group 2 (treated with Mel lavage [0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 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^[1-2]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^[3]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^[4],减弱下丘脑-垂体-肾上腺轴对应激的应答^[5],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 μ 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 ($c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Body weight (<i>m/g</i>)	AW/BW ($\times 10^{-4}$)
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** Δ	1.58 \pm 0.40 Δ

AW: Adrenal gland weight; BW: Body weight. ** $P < 0.01$ vs normal control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 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 Δ	1.57±0.45 $\Delta\Delta$	2.83±0.90 $\Delta\Delta$
DM+Mel2	6	8.82±4.43 Δ	1.92±0.47* Δ	3.16±1.04 $\Delta\Delta$

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

CRH: Corticotrophin-releasing hormone; ACTH: Adreno-corticotrophic hormone; CORT: Corticosterone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 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^[6], 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^[7] 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^[8] 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^[8] 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- α 、 β -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^[9] 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^[4] 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^[10]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^[11]给予大鼠致死剂量的脂多糖,发现血中 TNF- α 、IL-1 水平增加,外源性的褪黑素降低了血 TNF- α 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^[2],下丘脑室旁核和视上核 CRH mRNA 表达增加^[12]。最新研究^[13]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 β 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 β -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