

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00813

尼古丁增强大鼠胰岛素敏感性

魏姗姗,徐添颖,柯森方,徐学文,管云枫,缪朝玉*

第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433

[摘要] **目的** 研究尼古丁对大鼠胰岛素敏感性的影响及其与过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR- γ)的关系。**方法** 将10~11周龄的雄性SD大鼠随机分为生理盐水组和尼古丁组,两组又各分为3个亚组(1周、3周及6周组),分别给生理盐水(生理盐水组)或 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 尼古丁(尼古丁组)1周、3周、6周。各组均为皮下注射给药,每天1次。每周记录大鼠体质量变化。给药3周、6周后进行胰岛素耐量试验;给药1周、3周和6周后检测血清生化指标;给药6周后对各部位脂肪称量,并通过蛋白质印迹方法检测PPAR- γ 蛋白在内脏脂肪和皮下脂肪的表达情况。**结果** 尼古丁给药后大鼠体质量增幅减缓;胰岛素耐量试验显示给药3周、6周后胰岛素敏感性增强($P<0.05$);3周后血清三酰甘油明显下降($P<0.01$);6周后血清胰岛素敏感性相关指数明显增加($P<0.05$);给药6周后皮下脂肪、内脏脂肪的绝对质量和相对质量均下降($P<0.01$),且内脏脂肪下降幅度大于皮下脂肪,而内脏脂肪和皮下脂肪PPAR- γ 蛋白表达不改变。**结论** 尼古丁可增强大鼠胰岛素敏感性,该作用部分与尼古丁减少脂肪组织,尤其是内脏脂肪组织量及减少血清三酰甘油水平有关,而与脂肪组织中PPAR- γ 表达无关。

[关键词] 尼古丁;胰岛素敏感性;胰岛素抵抗;体重;脂肪;三酰甘油;PPAR γ

[中图分类号] R 587 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0813-05

Nicotine enhances insulin sensitivity in rats

WEI Shan-shan, XU Tian-ying, KE Sen-fang, XU Xue-wen, GUAN Yun-feng, MIAO Chao-yu*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of nicotine on insulin sensitivity in rats and its relationship with PPAR- γ . **Methods** Male Sprague-Dawley rats (10-11 weeks old) were randomly divided into saline group and nicotine group, and the two groups were further divided into 3 subgroups: 1 week, 3 weeks, and 6 weeks subgroups according to the time they were treated by different agents. Rats were subcutaneously injected with saline(saline group)daily or nicotine ($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, nicotine group) for 1 week, 3 weeks, and 6 weeks. The body weights of animals were recorded on a weekly basis. Insulin tolerance tests were performed at 3 weeks and 6 weeks after treatment, and the serum parameters were determined at 1 week, 3 weeks, and 6 weeks after drug administration. At the end of the experiment, fat tissue weights of different body parts were weighed, and PPAR- γ expression in the subcutaneous fat and visceral fat was detected by Western blotting analysis. **Results** The body weight increase of rats was inhibited after nicotine treatment. Insulin sensitivity of rats was significantly enhanced 3 weeks and 6 weeks after nicotine treatment($P<0.05$), serum triglyceride level was decreased significantly at 3 weeks after nicotine treatment($P<0.01$), insulin sensitivity indices were increased after 6 weeks ($P<0.05$), and both the weight and relative weight of subcutaneous and visceral fat tissues were significantly decreased 6 weeks after nicotine treatment($P<0.01$), with the visceral fat decreased more severely than that of the subcutaneous fat. PPAR- γ expressions in the subcutaneous fat and visceral fat tissues were not significantly different between saline and nicotine treated groups. **Conclusion** Nicotine can improve insulin sensitivity in rats, which is partly due to the fact that nicotine can decrease the serum triglyceride levels and fat tissue, especially the visceral fat tissue, but has no relation with PPAR- γ protein expression in fat tissue.

[Key words] nicotine; insulin sensitivity; insulin resistance; body weight; fat; triglyceride; PPAR gamma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):813-817]

传统的观点认为,尼古丁是香烟的主要成分,也是香烟导致胰岛素抵抗的主要成分^[1-3]。然而,我们

[收稿日期] 2010-02-04 **[接受日期]** 2010-06-28

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项基金(2009ZX09303-002)。Supported by the National Major Novel Drug Development Project (2009ZX09303-002).

[作者简介] 魏姗姗,硕士。E-mail: wshshan@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871271, E-mail: chaoyumiao@yahoo.com.cn

前期的尼古丁造模实验发现,尼古丁长期给药后大鼠空腹血清胰岛素降低,而血糖却没有明显升高,提示胰岛素增敏。有文献报道尼古丁长期给药可以减少肥胖大鼠的胰岛素抵抗^[1],但是尼古丁对正常大鼠胰岛素敏感性的影响尚无直接、详细的报道。本研究通过考察正常大鼠在尼古丁给药后不同时间点胰岛素敏感性相关指标的变化,探讨尼古丁对大鼠胰岛素敏感性的影响及时间进程,并初步考察该作用与过氧化酶体增殖物激活受体(PPAR- γ)的关系。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和药品 雄性SD大鼠,购于上海SIPPR/BK实验动物中心。0.9%氯化钠注射液,第二军医大学长海医院配制,批号S0605108;尼古丁,上海友思生物技术有限公司,批号070618,纯度99%;戊巴比妥钠,国药集团化学试剂有限公司,批号WS20060401;胰岛素(诺和灵R),诺和诺德公司,批号XVG0299。PPAR- γ 抗体,Santa Cruz公司。

1.2 尼古丁给药模型的制备 将10~11周龄的雄性SD大鼠随机分为生理盐水组和尼古丁组,两组又各分为3个亚组(1周、3周及6周组),分别给生理盐水(生理盐水组)或3 mg·kg⁻¹·d⁻¹尼古丁(尼古丁组)1周、3周、6周。各组给药途径均为皮下注射,每日1次,给药时间为15:00左右,给药容积为0.5 ml/kg,同时记录每周体质量的变化,并据此调整给药剂量。

1.3 胰岛素耐量试验 各组大鼠完成模型制备后禁食12 h,腹腔注射戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉。麻醉30 min后尾部取血测定基础血糖,然后腹腔注射胰岛素0.25 IU/kg,在给胰岛素后15、30、45及60 min测定血糖值。

1.4 血清生化指标测定 各组大鼠完成模型制备后禁食12 h,腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,心脏腔静脉采血。室温放置30 min后,4℃、2 000×g离心10 min,分离血清,取上清置于-20℃待测。采用ELISA测定血清血糖、血脂生化指标,包括总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油、血糖、胰岛素。并计算定量胰岛素敏感性指数(quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI)和HOMA法的胰岛素抵抗指数(HOMA insulin resistance index, HOMA-IR)。计算公式:QUICKI=1/[log FI+log FPG],HOMA-IR=(FI×FPG)/22.5,式中FI为空腹血浆胰岛素浓度(mIU/L),FPG为空腹血糖(mmol/L)。

1.5 组织称量 生理盐水和尼古丁6周组大鼠在采血后分别取不同部位组织称量,包括腹股沟皮下

脂肪、附睾周围脂肪、肾脏周围脂肪、腹膜后脂肪、网膜脂肪、肠系膜脂肪。内脏脂肪包括肾脏周围、腹膜后、网膜、肠系膜和附睾周围脂肪。

1.6 蛋白质印迹检测 PPAR- γ 蛋白表达的变化 总蛋白的提取采用一步法,即生理盐水和尼古丁6周组大鼠用戊巴比妥钠麻醉后立即取皮下(腹股沟)脂肪和内脏(肠系膜)脂肪,剪碎于10 ml试管中,0.1 g组织加入组织裂解液0.6 ml,匀浆。匀浆好的组织倒入离心管,将脂肪组织4℃,12 000×g离心15 min,去除油层。然后一起4℃ 1 2000×g离心10 min并取上清。将上清液移入另一离心管,重复上述离心步骤。并转移上清,Bradford法测定蛋白浓度。等蛋白量(25 μ g)的样品进行SDS-PAGE,然后通过电转膜转移印迹到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜放入封闭缓冲液封闭2 h,加入鼠抗人PPAR- γ 多克隆抗体,室温3 h。HRP标记的羊抗鼠和羊抗兔IgG,室温1 h。最后用PBS漂洗20 min。将硝酸纤维素膜用奥德赛近红外激光扫描系统扫描,得到蛋白印迹。条带经Gel凝胶成像分析系统扫描处理,计算PPAR- γ 蛋白相对表达量。PPAR- γ 蛋白相对表达量以特异性结合条带与内参结合条带的光密度(D值)比值表示。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,先采用方差分析,后采用成组t检验进行组间比较。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 体质量相关指标 由图1A可见,尼古丁给药后大鼠体质量增幅减缓。给药后第7天尼古丁6周组较生理盐水6周组体质量下降($P<0.05$),给药后第14天进一步下降($P<0.01$),并一直保持这一差异趋势。在与第0天体质量相比得到的体质量增加曲线(图1B)上可见,给药后第14天尼古丁6周组较生理盐水6周组体质量增加值减少($P<0.05$),给药后第21天进一步减少($P<0.01$),该差异持续存在。

2.2 胰岛素耐量试验 由图2A可见,给药3周后,尼古丁组的血糖降低百分比在给胰岛素后的各个时间点都大于生理盐水组,并且在30 min和45 min点与生理盐水组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。由图2B可见,给药6周后,尼古丁组的血糖降低百分比从给胰岛素后的30 min起明显大于生理盐水组,并且在60 min点与生理盐水组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 血清生化指标 由图3可见,尼古丁给药后不影响血清总胆固醇、低密度脂蛋白水平;血清高密度脂蛋白于第3周有一过性降低,较生理盐水组下降

19.7%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 血清三酰甘油在给药 1 周后较生理盐水组有下降趋势, 而到给药 3 周后较生理盐水组下降 0.39 mmol/L (43.7%), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并一直维持该低水平至给药 6 周后。尼古丁给药后血清葡萄糖水平于给药 1 周后有一过性升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 血清胰岛素于给药 1 周、3 周后均较生理盐水组有下降趋势, 到给药 6 周后较生理盐水组显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); QUICKI 在 3 周较生理盐水组有上升趋势, 6 周较生理盐水组显著上升 16.2%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HOMA-IR 在给药 1 周、3 周后较生理盐水组差异无统计学意义, 而到 6 周较生理盐水组显著下降 66.3%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

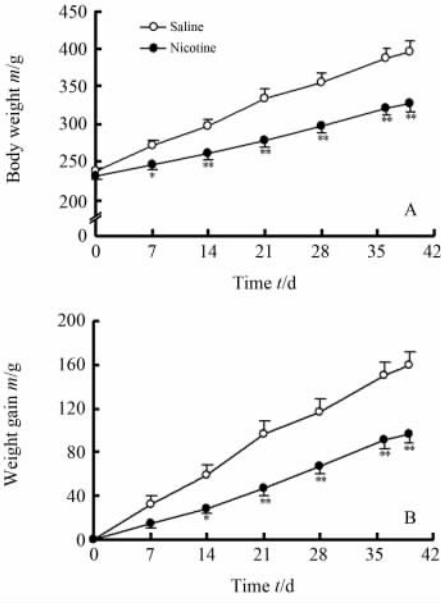


图 1 生理盐水组和尼古丁组大鼠体质量变化

Fig 1 Body weight changes of saline- and nicotine-treated rats A: Body weight; B: Weight gain. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs saline group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.4 组织称量 由表 1 可见, 尼古丁 6 周组与生理盐水 6 周组相比, 皮下脂肪、附睾周围脂肪、肾周和腹膜后脂肪、胃肠道周围脂肪、内脏脂肪的绝对质量均有明显下降 ($P < 0.01$)。进一步, 由组织质量比体质量得到的相对质量可见, 尼古丁 6 周组各部位脂肪相对质量也比生理盐水 6 周组明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, 尼古丁 6 周组肾周和腹膜后脂肪相对质量、胃肠道周围脂肪相对质量和内脏脂肪相对质量下降最多, 分别较生理盐水 6 周组下降 56.92%、54.30% 和 46.32%。另外, 尼古丁 6 周组皮下脂肪质量与内脏脂肪质量之比生理盐水 6 周组上升, 但差异无统计学意义。

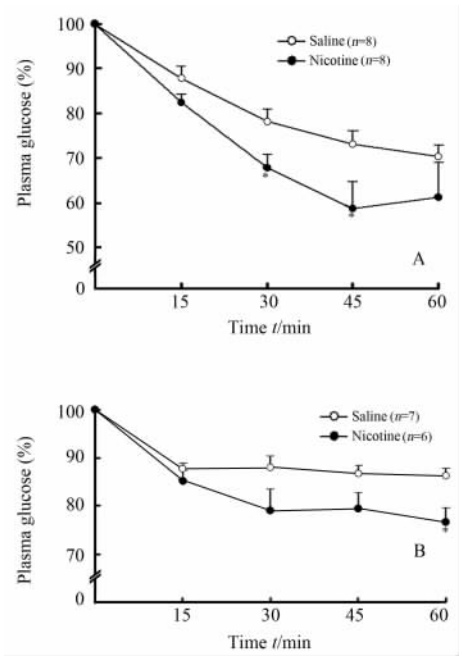


图 2 生理盐水组和尼古丁组大鼠胰岛素耐量试验血糖曲线

Fig 2 Plasma glucose curve of insulin tolerance test of nicotine- and saline-treated rats

A: 3 weeks insulin tolerance test; B: 6 weeks insulin tolerance test. * $P < 0.05$ vs saline group. $\bar{x} \pm s$

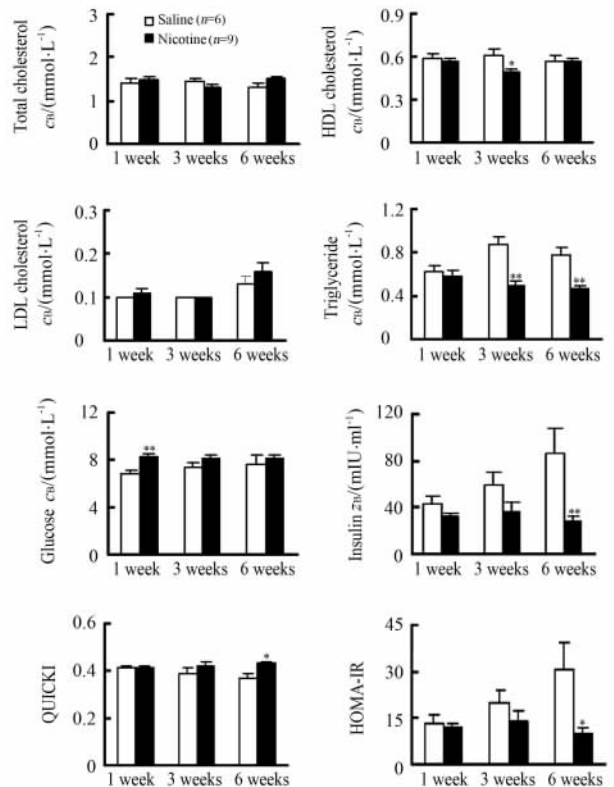


图 3 生理盐水组和尼古丁组大鼠血清指标检测结果

Fig 3 Serum parameters in saline- and nicotine-treated rats

HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; HOMA-IR: HOMA insulin resistance index; QUICKI: Quantitative insulin-sensitivity check index. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs saline group. $\bar{x} \pm s$

表 1 生理盐水组和尼古丁组大鼠各部位脂肪称量

Tab 1 Fat tissue weights in different body parts of saline- and nicotine-treated rats

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Index	Saline	Nicotine
Body weight m/g	387±18	312±10**
Tissue weight m/mg		
Subcutaneous fat	20 386±1 132	11 044±303**
Epididymal fat	4 442±200	2 636±282**
Perirenal and retroperitoneal fat	4 984±530	1 802±433**
Omental and mesenteric fat	3 590±238	1 362±314**
Visceral fat	13 016±541	5 800±1 002**
Tissue weight to body weight(mg · g ⁻¹)		
Subcutaneous fat	52.74±1.80	35.55±1.40**
Epididymal fat	11.65±0.99	8.39±0.68*
Perirenal and retroperitoneal fat	13.10±1.64	5.64±1.23**
Omental and mesenteric fat	9.35±0.74	4.27±0.88**
Visceral fat	34.10±2.63	18.30±2.68**
Subcutaneous fat to visceral fat	1.590±0.154	2.257±0.559

* P<0.05, ** P<0.01 vs saline group. n=5, $\bar{x} \pm s$

2.5 PPAR- γ 蛋白表达的变化 由图 4 可见,尼古丁治疗 6 周后,PPAR- γ 在皮下脂肪组织、内脏脂肪组织表达与生理盐水组比较差异均无统计学意义。

但是吸烟而非鼻吸法引起胰岛素抵抗^[3]。此外,Swislocki 等^[4]报道无烟尼古丁不损害大鼠糖耐量。Liu 等^[1]发现长期口服尼古丁可改善肥胖大鼠的的胰岛素抵抗。然而另一些报道却显示在男性志愿者中长期使用尼古丁口香糖会诱导高胰岛素血症和胰岛素抵抗^[5]。由此可见,尼古丁对胰岛素行为的影响不能简单等同于吸烟的作用,需要在更多动物模型上加以考察阐明。

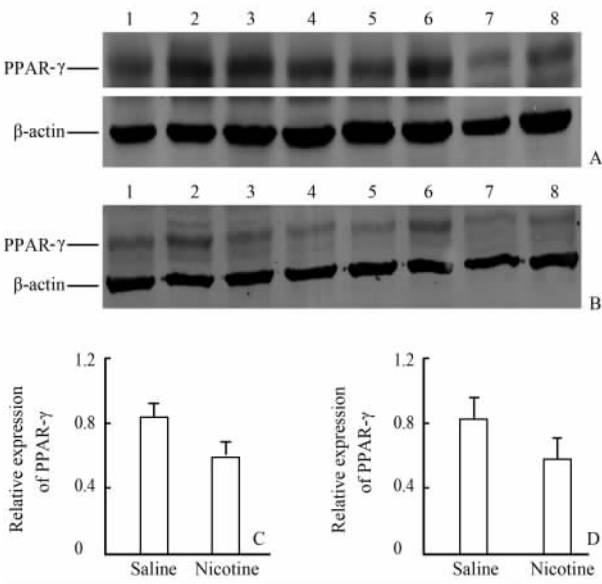


图 4 生理盐水组和尼古丁组大鼠脂肪组织 PPAR- γ 蛋白的表达

Fig 4 PPAR- γ expression in fat tissues of saline- and nicotine-treated rats

A, C: Subcutaneous fat tissue; B, D: Visceral fat tissue. 1-4: Saline group; 5-8: Nicotine group. n=4, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

目前,已有研究普遍认为吸烟可损害胰岛素行为,导致胰岛素抵抗。但是,虽然尼古丁是烟草的主要成分,有关尼古丁对胰岛素抵抗的影响却是有争议的。Attvall 等^[2]报道血浆尼古丁水平在吸烟和鼻吸法(每份包装中平均尼古丁含量为 1 mg)中是相似的。

本研究采用正常成年大鼠,模型制备方法参考本室前期建立的尼古丁给药模型^[6]。尼古丁剂量为 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹(相当于人每天 2 包烟的剂量)。胰岛素敏感性评价采用胰岛素耐量试验考察大鼠的刺激状态的胰岛素敏感性情况,采用 QUICKI 和 HOMA-IR 两个指标考察大鼠基础状态的胰岛素敏感性情况。这 3 种方法目前在国际上比较常用,不仅相对金标准简单易行,而且与金标准有较好的相关性^[7]。3 周胰岛素耐量试验显示尼古丁组的血糖下降更快,且下降得更低,说明尼古丁给药 3 周后已能显著增强刺激状态下的大鼠胰岛素敏感性。另外,反映基础胰岛素敏感性状态的 QUICKI 和 HOMA-IR 指标在 3 周也显示胰岛素增敏的趋势,但差异无统计学意义。尼古丁给药 6 周后胰岛素耐量试验亦显示胰岛素刺激状态下胰岛素敏感性增强,同时 QUICKI 和 HOMA-IR 指标显示大鼠胰岛素敏感性显著增强。因此,上述 3 个指标的结果都一致证明了尼古丁增强正常大鼠的胰岛素敏感性。然而,我们也注意到,虽然 QUICKI 和 HOMA-IR 指标显示 6 周的胰岛素敏感性要较 3 周进一步增强,但 6 周的胰岛素耐量试验并未显示出与 3 周同样或更强的降糖趋势,我们认为这主要是胰岛素耐量试验固有的缺陷造成的。因为从血清指标可以

看出,尼古丁给药后6周胰岛素水平显著下降,因此虽然根据体质量外源性补充了胰岛素进行胰岛素耐量试验,但是仍没有使尼古丁组达到生理盐水组的胰岛素水平,在这样的情况下,尼古丁组的降糖作用,即胰岛素敏感性水平,也就不能通过胰岛素耐量试验很好地体现出来。另外,血清指标中血糖水平在尼古丁给药1周后升高,但是随着给药时间的延长,给药后3周、6周均与生理盐水组相比无明显差异。以后的多次造模试验也证实尼古丁长期给药并不会引起正常大鼠血糖升高。因此,1周时的血糖升高仅是一过性的,可能由应激引起。

我们进一步对尼古丁给药后各部位脂肪进行称量并观察了脂代谢相关血清学指标的变化。脂肪称量的结果显示,尼古丁给药可显著减少皮下及内脏脂肪含量,并且内脏脂肪含量的减少更为明显。尼古丁减少大鼠的脂肪量,可能的原因有:尼古丁增强脂蛋白酶活性以及 mRNA 表达水平,促进脂肪的消耗^[8];尼古丁促进脂肪细胞的分解,抑制脂肪酸合酶活性^[9]。另外脂代谢相关血清学指标显示尼古丁给药后3周起血清三酰甘油水平显著降低。胰岛素抵抗发生机制中的脂质超负荷理论和炎症理论都认为胰岛素抵抗的发生与脂肪组织密切相关^[10]。脂质超负荷理论认为当脂肪组织无法存储过量的脂质,使得脂质在肌肉和肝脏不当积累,会导致胰岛素作用异常,发生胰岛素抵抗。炎症理论则认为,脂肪细胞会募集巨噬细胞并释放炎症因子导致胰岛素受体底物受抑制引起胰岛素抵抗。很多研究显示过量的身体脂肪,特别是腹部和内脏脂肪是引发胰岛素抵抗的一个基本原因^[11]。另外,高三酰甘油水平与胰岛素抵抗的发生密切相关,降低三酰甘油的含量,对于改善胰岛素敏感性有重要意义^[12-13]。因此我们认为尼古丁通过调节脂代谢相关过程来发挥增强胰岛素敏感性的作用。

最后,为了考察尼古丁增强胰岛素敏感性的分子机制,我们检测了胰岛素增敏的重要靶蛋白之一 PPAR- γ 在皮下和内脏脂肪的表达。我们发现尼古丁组皮下脂肪组织、内脏脂肪组织的 PPAR- γ 蛋白与生理盐水组无差异。这提示尼古丁不是通过该机制增强胰岛素敏感性。

因此,本研究说明尼古丁可通过调节脂代谢相关途径,而不是通过调节脂肪组织 PPAR- γ 蛋白表达来发挥增强胰岛素敏感性的作用。虽然尼古丁在全身作用广泛,但其胰岛素增敏作用很可能由特异性的尼古丁受体介导。2型糖尿病患者大多伴有肥胖,而目前的胰岛素增敏药罗格列酮类是 PPAR- γ 激动剂。激活 PPAR- γ 在脂肪组织的不良反应是

促进脂肪细胞分化增殖,因而无法改善肥胖症状^[14]。如能开发特异性的针对改善脂代谢的尼古丁受体激动剂,将为防治糖尿病和心血管疾病提供新策略和新靶标。

[参考文献]

- [1] Liu R H, Mizuta M, Matsukura S. Long-term nicotine oral administration reduce resistance in obese rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 458:227-234.
- [2] Attvall S, Fowelin J, Lager I, Von Schenck H, Smith U. Smoking induces insulin resistance—a potential link with the insulin resistance syndrome[J]. *J Intern Med*, 1993, 233:327-332.
- [3] Eliasson B, Smith U, Lonnroth P. No acute effects of smoking and nicotine nasal spray on lipolysis measured by subcutaneous microdialysis[J]. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27:503-509.
- [4] Swislocki A L, Tsuzuki A, Tait M, Khuu D, Fann K. Smokeless nicotine administration is associated with hypertension but not with a deterioration in glucose tolerance in rats[J]. *Metabolism*, 1997, 46:1008-1012.
- [5] Eliasson B, Taskinen M R, Smith U. Long-term use of nicotine gum is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance [J]. *Circulation*, 1996, 94:878-881.
- [6] 蓝晓红,徐添颖,缪朝玉. 尼古丁给药和撤药模型的制备与评价 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29:156-161.
Lan X H, Xu T Y, Miao C Y. Establishment and evaluation of a nicotine-treatment and -withdrawal rat model[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29:156-161.
- [7] Lee S, Muniyappa R, Yan X, Chen H, Yue L Q, Hong E G, et al. Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294: E261-E270.
- [8] Sztalryd C, Hamilton J, Horwitz B A, Johnson P, Kraemer F B. Alterations of lipolysis and lipoprotein lipase in chronically nicotine-treated rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996, 270: E215-E223.
- [9] An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou M H. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:26793-26801.
- [10] Taubes G. Prosperity's plague[J]. *Science*, 2009, 325:256-260.
- [11] Yang L, Samarasinghe Y P, Kane P, Amiel S A, Aylwin S L. Visceral adiposity is closely correlated with neck circumference and represents a significant indicator of insulin resistance in WHO grade III obesity[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, Dec 29. [Epub ahead of print].
- [12] Chubb S A, Davis W A, Davis T M. Interactions among thyroid function, insulin sensitivity, and serum lipid concentrations: the Fremantle diabetes Study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90:5317-5320.
- [13] Fernández-Real J M, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete J M, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94:237-245.
- [14] 李义. 由胰岛素信号通路筛选糖尿病药物作用靶点[J]. *基础医学与临床*, 2004, 24:601-603.