参考文献:

- [1] 阎胜利, 赵世华, 李长贵, 等. 山东沿海居民高尿酸血症及痛风五年随访研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27: 548-522.
- [2] Ishikawa T, Aw W, Kaneko K, et al. Metabolic interactions of purine derivatives with human ABC transporter ABCG2: Genetic testing to assess gout risk[J]. *Pharmaceuticals*, 2013, 6(11): 1347-1360.
- [3] 林志健, 刘小青, 高新颜, 等. 高嘌呤食饵诱导的鹌鹑尿酸及糖脂代谢紊乱模型的发病特点与病理机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12): 2458-2460.
- [4] 崔云龙, 嵇志珍, 姚桂玲, 等. 分光光度法测定红细胞嘌呤核苷磷酸化酶[J]. 武警医学, 1993, 4(1): 18-20.
- [5] 杨金良. 鸟嘌呤脱氨酶速率法测定及在肝病中的应用[J]. 陕西医学检验, 1993, 8(4): 199-200.
- [6] Takashi Y, Makiko Y, Maki K. Feedback inhibition of amidophosphoribosyl transferase regulates the rate of cell growth via purine nucleotide, DNA, and protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(24): 21285-21291.
- [7] Dauphinot L, Mockel L, Cahu J, et al. Transcriptomic approach to Lesch-Nyhan disease[J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2014, 33(4-6): 208-217.
- [8] Gras J. ULODESINE[J]. *Drugs of the Future*, 2014, 39 (2): 123-128.
- [9] 孔悦, 张冰, 刘小青, 等. 菊苣提取物对高甘油三酯、高尿酸并高血糖血症大鼠影响的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 2(6): 379-380.
- [10] 萨翼, 张冰, 刘小青, 等. 菊苣提取物对鹌鹑血尿酸血脂的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(4): 227-229.

(编辑: 宋威)

应用 ¹H-NMR 研究高果糖对白脂肪组织代谢组的影响

杨永霞¹, 郑凌云¹, 陈阿丽², 王亚玲^{1,3}, 王琳琳^{1,3}, 韩智慧^{1,3}(1.广东药学院基础学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药学院中山校区医药化工学院, 广东 中山 528458; 3.广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 采用基于核磁共振的代谢组学方法研究高果糖喂养对白脂肪代谢组的影响。**方法** 选取 16 只 Wistar 大鼠, 将其适应 1 周后随机分为正常对照组和模型组, 每组 8 只。采用 100 g·L⁻¹ 果糖水饲喂 8 周建立胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)模型, 对照组给予与模型组等体积的纯净水。8 周末取大鼠白脂肪组织, 运用主成分方法(principal component analysis, PCA)对白脂肪组织水溶性提取液的核磁共振氢谱(¹H-NMR)谱进行分析。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠的白脂肪组织代谢组明显变化, 其中丙氨酸、氧化三甲胺/甜菜碱、胆碱和丙三醇含量升高, 乳酸、脂质、谷氨酸、甘油磷脂胆碱/磷脂胆碱和不饱和脂类含量降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 采用核磁共振代谢组学方法研究高果糖对白脂肪代谢组的影响, 阐明了 IR 状态下白脂肪组织提取液的代谢特征及其相应生化代谢过程的改变。

关键词: 高果糖; 胰岛素抵抗; 代谢组学; 核磁共振氢谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0013-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.004

Application of ¹H-NMR Spectroscopy for Investigating Effects of High Fructose on Metabonome of White Adipose Tissues of Rats

YANG Yongxia¹, ZHENG Lingyun¹, CHEN Ali², WANG Yaling^{1,3}, WANG Linlin^{1,3}, HAN Zhihui^{1,3}(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. School of Medicinal Chemical Industry, Zhongshan Campus, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458 Guangdong, China; 3. College of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the metabolomics changes of white adipose tissues in insulin resistance rats induced by

收稿日期: 2014-08-14

作者简介: 杨永霞, 女, 副教授, 研究方向: 代谢组学与药物毒理学。Email: sheepma@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(21005022)。

fructose feeding by using ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$). **Methods** Sixteen Wistar rats were evenly divided into control group and model group after adaptive feeding for one week. Rats in the model group were given 100 g/L of fructose water for 8 weeks to induce insulin resistance, and rats in the control group were given pure water in the same volume as the model group. At the end of the 8th week, the white adipose tissues were isolated and the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of each sample was collected for principal component analysis. **Results** Compared with the control group, the metabolomics of the white adipose tissues in model rats had obvious changes, showing as higher levels of alanine, trimethylamine oxide/betaine, choline and glycerol, and lower levels of lactic acid, lipid, glutamate, choline glycerophosphate/phosphatidylcholine, and unsaturated lipid, and the differences were statistically significant. **Conclusion** $^1\text{H-NMR}$ based on metabonomics method can show the metabolic characteristics of white adipose tissues in insulin resistance rats induced by high fructose feeding, and provide biochemical changes of white adipose tissues.

Keywords: High fructose; Insulin resistance; Metabonomics; ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)

胰岛素抵抗是多种代谢性疾病的中心环节,也是2型糖尿病发病的重要机制^[1]。研究表明,慢性高果糖喂养可诱导啮齿类动物发生胰岛素抵抗(IR)和肝内脂质沉积^[2]。过多果糖摄入引起肥胖、高血压、血脂代谢异常、2型糖尿病等代谢性疾病^[3-4]。由于膳食果糖不能刺激胰岛素的分泌同时又削弱了餐后脑肽的抑制作用,因此,长期大量的果糖摄入很可能导致热量摄入增加,诱发体质量增加及肥胖症^[5],而肥胖的特点就是白脂肪增多。因此,本研究以高果糖饲喂诱导大鼠胰岛素抵抗模型^[6],采用核磁共振(NMR)代谢组学方法的核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)并结合PCA技术观察高果糖诱导的大鼠IR模型白脂肪代谢组的变化,筛选代谢标志物,进而更深入认识胰岛素抵抗状态下白脂肪组织的代谢变化。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar大鼠16只,雄性,SPF级,体质量180~220 g,购于中山大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(粤)2007-0081。分笼饲养,自由饮水进食,温度:(23±2)℃,湿度:(50±10)%,明/暗:12 h/12 h。经过适应性饲养1周后,随机分为2组,即正常对照组和IR模型组。

1.2 试剂及仪器 果糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、叠氮化钠(NaN_3)、肝素($(\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_{34}\text{S}_4)_n$)、乙腈(CH_3CN)均为国产分析纯;重水(D_2O),青岛腾龙科技有限公司。500 MHz Bruker核磁共振波谱仪,瑞士Bruker公司;5 mm核磁管,北京欣维尔玻璃仪器有限公司;KDC-220HR型 Heraeus台式冷冻离心机,上海蒲盐贸易有限公司;TTL-DC II型氮吹,北京同泰联科技发展有限公司。

1.3 模型复制 适应性饲养1周后,正常对照组继续以普通标准大鼠饲料喂养,饮用纯净水。模型组以100 g·L⁻¹的果糖水取代纯净水喂养,持续8周。

1.4 样本收集和处理 实验8周后,将大鼠隔夜禁食,次日脊椎脱臼处死,取白脂肪组织,称量(300±5)mg置于冰块上,液氮下用研钵研碎,并用2 mL乙腈提取,转入2 mL离心管(EP)中,4℃离心(15000 r·min⁻¹, 10 min),取上清,冷冻干燥后用400 L重水和150 L PBS复溶。置于4℃冰箱保存,备用。

1.5 NMR实验 NMR采用Bruker 500 MHz核磁共振仪,调用预饱和的NOESYPR1D(recycle delay-G1-90°-t1-90°-G2-tm-90°-acquisition)脉冲序列,相关测定参数如下:回波时间100 ms,采样点数32k,采样累加次数128次,控制温度在298 K。自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过32k傅立叶变换转为NMR谱图。将图谱文件夹导入Topspin(Version 2.0, Bruker Biospin),以3-三甲基硅基氘代丙酸钠(sodium 3-trimethylsilyl-(2, 2, 3, 3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate, TSP)(δ 0.00)为化学位移参考峰的位置,对图谱进行手动相位校正和基线校正。

1.6 数据预处理和主成分分析 对所有的 ^1H NOESYPR1D谱用AMIX(Version 2.0, Bruker Biospin, Germany)进行自动积分,积分区间 δ 0.5~8.5,积分间隔0.003 ppm。为了消除剩余水峰引起的影 响,将积分区间 δ 4.4~5.2的积分值设为零。对产生的所有积分数据进行归一化处理,以Excel文件格式保存,用于模式识别分析。

1.7 模式识别及统计分析 将归一化后的数值导入SIMCA-P⁺12.0软件(Umetrics, Sweden)进行PCA的模式识别分析。分析结果用得分图(score plot)和载荷图

啮齿类动物, 白色脂肪组织过多是肥胖的特点。有报道^[11-12]恶性肿瘤患者和糖尿病大鼠的脂肪组织发生退化。而多项研究结果^[13]显示, 肥胖尤其是腹型肥胖是2型糖尿病发病的独立危险因素。所以, 白脂肪在代谢性疾病中可能存在代谢紊乱。本研究应用¹H-HMR的代谢组学方法研究了高果糖诱导胰岛素抵抗大鼠模型白脂肪组织的代谢变化, 并对其进行了PCA分析和统计分析, 发现胰岛素抵抗大鼠模型白脂肪组织提取液中丙氨酸、氧化三甲胺/甜菜碱、胆碱和丙三醇的含量升高, 乳酸、脂质、谷氨酸、甘油磷脂胆碱/磷脂胆碱和不饱和脂类含量降低, 且具有统计学意义。

实验结果显示, 模型组中乳酸的含量低于正常对照组。乳酸是糖酵解过程中由葡萄糖无氧降解而成的, 同时伴有三磷酸腺苷(ATP)生成, 说明胰岛素抵抗模型大鼠能量代谢发生了紊乱^[8]。长期高胰岛素状态下, 脂肪细胞GulT4表达下调或活性下降, 使葡萄糖转运能力下降, 加重胰岛素抵抗, 导致体内葡萄糖升高^[14]。而丙氨酸是生糖的氨基酸, 葡萄糖通过高果糖代谢途径增加, 而丙氨酸生糖能力会减弱, 最终导致了模型组中丙氨酸的含量增加。谷氨酸是糖代谢与三羧酸循环的中间产物^[15]。本实验中模型组中谷氨酸的含量低于正常对照组, 则说明模型组中糖代谢和三羧酸循环受到调控。

氧化三甲胺和肌酸等含氮物质的升高也预示着高果糖喂养造成了大鼠肝脏、胰腺的损伤进而引起其周围脂肪代谢的异常; 甜菜碱可以调节脂肪的代谢、重新分配体内脂肪, 其作用机制有很大一部分与其有3个活跃的甲基有关^[16]。早期的研究表明它可以节约部分胆碱^[17], 故而白脂肪提取液中胆碱和甘油磷脂胆碱/磷脂胆碱的含量在模型组大鼠中是增加的。

本实验采用高果糖诱导的胰岛素抵抗模型, 果糖可迅速被肝脏利用, 从而越过糖分解过程中的磷酸果糖调节步骤, 影响脂质代谢。同时, 高果糖饮食可抑制甘油三酯的清除, 导致甘油三酯在血液中的积累, 形成高甘油三酯血症, 向脂肪细胞积聚, 并在一系列的脂肪酶的作用下分解为丙三醇, 故其在模型组的含量比正常对照组高, 同样也导致腹内脂肪质量增加, 脂肪细胞变大, 表现为腹内型的肥胖^[14]。而随着丙三醇在不同组织的蓄积, 可能引起机体其他的病理生理变化, 如脂肪细胞因子的合成, 过多脂质沉积于非脂肪组织, 反而加重胰岛素抵抗, 最后引起糖代谢和脂代谢的异常^[18]。

综上所述, 本研究通过核磁共振的代谢组学方法

筛选出胰岛素抵抗模型白脂肪组织的代谢标志物群及其相关生化过程的改变, 揭示了高果糖诱导的胰岛素抵抗对白脂肪代谢的影响。

参考文献:

- [1] 李佳川, 孟宪丽, 范昕建, 等. 黄连改善胰岛素抵抗药效物质基础研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1855-1858.
- [2] Nseir W, Nassar F, Assy N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(21): 2579-2588.
- [3] Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia[J]. *Nutr Metab(Lond)*, 2005, 2(1): 5.
- [4] Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(4): 537-543.
- [5] Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2963-2972.
- [6] 程海波, 司晓晨, 尚文斌, 等. 高脂饲料和高果糖餐分别诱导胰岛素抵抗大鼠模型的胰岛素敏感性[J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 121-123.
- [7] Wang HJ, Wang L, Zhang HL, et al. ¹H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 121.
- [8] Xu JJ, Zhang J, Dong JY, et al. Metabonomics studies of intact hepatic and renal cortical tissues from diabetic db/db mice using high-resolution magic-angle spinning ¹H-NMR spectroscopy[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(6-7): 1657-1658.
- [9] Machmoud MF, EI NM, EI BHM. Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(1): 155-162.
- [10] Yang YX, Wang LL, Wang SM, et al. An integrated metabonomic approach to studying metabolic profiles in rat models with insulin resistance induced by high fructose[J]. *Mol BioSyst*, 2014, 10: 1803-1811.
- [11] Prins JB, Walker NI, Winterford CM, et al. Human adipocyte apoptosis occurs in malignancy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205(1): 625-630.
- [12] Magun R, Gagnon A, Yaraghi Z, et al. Expression and regulation of neuronal apoptosis inhibitory protein during adipocyte differentiation[J]. *Diabetes*, 1998, 47(12): 1948-1952.
- [13] 付丽媛, 杨进, 王灿晖, 等. 健脾增液汤对肥胖2型糖尿病大鼠脂肪-胰岛素轴的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 141-143.
- [14] 吴海娅, 魏丽, 王珠, 等. 高脂或高糖饮食诱导胰岛素抵抗大鼠的附睾脂肪组织视黄醇结合蛋白4表达[J]. 上海医学, 2007, 3(6): 446-449.
- [15] 李后开. 肥胖易感与肥胖抵抗大鼠的代谢组学与转录组学研究[D]. 上海中医药大学, 2008: 22-23.

- [16] 包红朵, 钟翔, 王恬. 甜菜碱与脂肪代谢[J]. 家畜生态报道, 2008, 29(3): 6-10.
- [17] Lowry KR, Izquierdo OA, Baker DH. Efficacy of betaine relative to choline as a dietary methyl donor[J]. Poult Sci, 1987, 66: 135-140.
- [18] 唐勇, 张万星, 宋光耀, 等. 张万星胰岛素抵抗人群皮下脂肪组织中脂肪甘油三酯脂酶和激素敏感性脂肪酶表达减低[J]. 临床荟萃, 2010, 25(1): 25-28.

(编辑: 宋威)

柚皮苷对豚鼠离体气管平滑肌作用的机制研究

裴 昆¹, 夏放高², 陈海芳¹, 罗小泉¹, 易徐航¹, 董 晶¹, 杨武亮¹ (1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 2. 江西钟山药业有限责任公司, 江西 九江 332501)

摘要: **目的** 考察柚皮苷对正常及多种致痉剂诱导的豚鼠气管平滑肌收缩功能的影响及其作用机制。**方法** 采用离体气管恒温灌流的方法, 取豚鼠气管, 在 K-H 液中制备豚鼠离体气管环, 在其静息张力状态下以及用乙酰胆碱(Ach)、组胺(His)、氯化钙(CaCl₂)、无钙时 Ach 诱导细胞内钙释放和高钙时诱发细胞外钙内流条件下, 通过 BL-420S 生物机能实验系统测定其张力的变化, 考察柚皮苷对离体豚鼠气管平滑肌张力的影响。**结果** 柚皮苷低剂量浓度(0.0172~0.5504)mmol·L⁻¹时, 对静息状态下的豚鼠离体气管平滑肌有一定的收缩作用, 高剂量浓度(0.5504~1.3780)mmol·L⁻¹时舒张气管平滑肌, 且呈剂量依赖性; 使致痉剂 Ach、His、CaCl₂ 收缩豚鼠离体气管平滑肌的量效曲线非平行性右移, 最大效应降低; 抑制加入高钙后引发细胞外钙内流导致的收缩。**结论** 柚皮苷舒张气管平滑肌作用机制可能与抑制豚鼠气管平滑肌上 M 受体、H₁ 受体和阻断 Ca²⁺ 通道从而抑制细胞 Ca²⁺ 内流有关。

关键词: 柚皮苷; 豚鼠; 气管平滑肌; 细胞外钙内流

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0017-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.005

Study on Therapeutic Mechanism of Naringin on Isolated Tracheal Smooth Muscle of Guinea Pigs

PEI Kun¹, XIA Fanggao², CHEN Haifang¹, LUO Xiaoquan¹, YI Xuhang¹, DONG Jing¹, YANG Wuliang¹(1. Ministry of Education Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jiangxi Zhongshan Pharmaceutical Co., Ltd, Jiujiang 332501 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of naringin on the contraction of isolated tracheal smooth muscle of guinea pigs induced by resting tension or spasmogens, and to explore its therapeutic mechanism. **Methods** Isolated tracheal thermostatic perfusion method was used. The guinea pig tracheal smooth muscle was isolated in the K-H solution. Under the resting tension or stimulated by acetylcholine(Ach), histamine (His), calcium chloride(CaCl₂), calcium-free Ach-induced intracellular Ca²⁺ releasing, or extracellular Ca²⁺ influx at the high concentration of Ca²⁺, the tension of isolated guinea pig tracheal smooth muscle was observed by BL-420S biological function experiment systems, and the effect of naringin on the tension was evaluated. **Results** Naringin at the concentrations of 0.0172~0.5504 mmol·L⁻¹ could induce the contraction of isolated trachea at resting state, and when at the concentrations of 0.5504~1.3780 mmol·L⁻¹, naringin could induce the relaxation of the isolated trachea in concentration-dependent

收稿日期: 2014-09-17

作者简介: 裴昆, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药物质基础与质量控制。Email: peikun1208@163.com。通讯作者: 杨武亮, 教授, 研究方向: 中药物质基础与质量控制研究。Email: yangwuliang@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81460575, 81260612); 江西省自然科学基金(20132BAB205092); 江西中医药大学江西省研究生创新专项资助项目(YC2014-S281)。