

1,2,3-三磷酸肌醇对四氧嘧啶型糖尿病小鼠降血糖作用研究

江洪^{a,b}, 马续红^c (华中农业大学, a. 化学系, b. 生物学研究所, c. 化学系, 武汉 430070)

摘要:目的 研究 1,2,3-三磷酸肌醇[Ins(1,2,3)P3]对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的降血糖作用。方法 用小麦麸皮植酸酶部分水解植酸,水解产物经 717 型阴离子交换树脂吸附,0.05~0.7 mol·L⁻¹ 盐酸梯度洗脱分离得到 Ins(1,2,3)P3。将四氧嘧啶导致的糖尿病小鼠随机分成 5 组,每天分别 ip 生理盐水、10、50、100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的 Ins(1,2,3)P3 钠盐、盐酸苯乙双胍 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹。连续注射 12 d,末次空腹眼眶取血测血糖。结果 Ins(1,2,3)P3 可降低四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的血糖值,在浓度为 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 与 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量时,显著降低糖尿病小鼠血糖水平,对正常小鼠血糖无影响。Ins(1,2,3)P3 可提高四氧嘧啶型糖尿病小鼠及正常小鼠的胸腺与脾脏指数,抵抗四氧嘧啶引起的小鼠胸腺、胰腺萎缩。结论 Ins(1,2,3)P3 对糖尿病小鼠具有降血糖作用。

关键词:植酸; 1,2,3-三磷酸肌醇; 降血糖; 四氧嘧啶

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2009)02-089-04

Studies on the Hypoglycemic Activity of 1,2,3-inositol Triphosphate in Diabetes Mellitus Mice Induced by Alloxan

JIANG Hong^{a,b}, MA Xuhong^c (Huazhong Agriculture University, a. Department of Chemistry, b. Institute of Chemical Biology, c. Department of Chemistry, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of 1,2,3-inositol triphosphate [Ins(1,2,3)P3] on the blood glucose of Alloxan-diabetic mice. **METHODS** Phytic acid was partially hydrolyzed by phytase from wheat bran. The partial hydrolyzed solutions were pumped into a column containing 717 strong anion-exchange resin, then delivered a linear gradient of 0.05–0.7 mol·L⁻¹ HCl giving Ins(1,2,3)P3. Alloxan-induced diabetic mice were divided into 5 groups randomly, and intra-peritoneal injected with saline, 10, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Ins(1,2,3)P3, 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹ PHF respectively for 12 days successively. Fasting orbital blood samples were collected for measurement of glucose at the end of the experiment. **RESULTS** Ins(1,2,3)P3 was found to reduce blood glucose level in alloxan-diabetic mice markedly at doses of 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, but no effect on normal mice. Compared with the model control group, Ins(1,2,3)P3 had the ability to raise the thymus and spleen indexes of diabetic mellitus mice and normal mice, inhibiting the atrophy of thymus and pancreas of the diabetic mice induced by alloxan. **CONCLUSION** Ins(1,2,3)P3 has good hypoglycemic effect on Alloxan-diabetic mice.

KEY WORDS: phytic acid; 1,2,3-inositol triphosphate; hypoglycemic activity; alloxan

植酸(Phytic acid)又名肌醇六磷酸,系统命名为 1,2,3,4,5,6-肌醇六磷酸酯(InsP6)。植酸在种子植物的种皮中,通常占种子干重的 0.5%~2%。植酸降解时会产生肌醇和低磷酸肌醇(InsP1-InsP5)。低磷酸肌醇在动植物体内发挥着不同的生理功能,其中三磷酸肌醇(InsP3)在动植物体内具有重要生理功能。Ins(1,4,5)P3 是细胞内第二信使,能促进

细胞内 Ca²⁺ 动员。Ins(1,4,5)P3 在调节细胞代谢、分泌、收缩、增殖等功能方面起着重要作用。研究表明肌醇有利于脂肪的消化利用,能提高糖尿病患者神经的传导性,其原因可能是肌醇是磷脂酰肌醇和磷酸肌醇的先导物^[1]。1.0% 和 1.5% 植酸能降低糖尿病-II 型大鼠中血清和肝脂肪水平,降低血清中总胆固醇和低密度脂蛋白-胆固醇水平,而高密度脂蛋

基金项目:国家“十五”重大科技专项资助项目(2001BA501A20);湖北省自然科学基金项目(2006ABA163)

作者简介:江洪,男,博士,副教授 Tel:(027)87287492 E-mail:jianghong@mail.hzau.edu.cn

白水平升高^[2]。植酸盐能降低糖尿病-II型大鼠血糖空腹血糖和餐后血糖。葡萄糖耐量实验表明植酸饮用组的血糖水平明显低于对照组^[3]。

植酸和肌醇具有降血糖功能,三磷酸肌醇是植酸的部分降解产物,也可以说是肌醇的不完全磷酸酯化产物,它是否也具有该功能是值得研究的,而Ins(1,2,3)P3具有很强的抗氧化功能^[4],通常具有抗氧化功能的化合物大都能减轻糖尿病症状^[5],因此笔者旨在通过酶法水解得到特定结构的三磷酸肌醇,进而研究其是否具有降血糖功能。

1 材料与与方法

1.1 试药与仪器

1.1.1 试药 四氧嘧啶(美国Sigma公司);葡萄糖试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);盐酸苯乙双胍(江苏赫海药业有限公司);其他均为国产分析纯试剂。

1.1.2 仪器 质谱仪Agilent 1100 series MSD trap, 质谱分析条件:样品浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,用1%甲酸调pH为4.0,锥孔电压为29 V。Bruker DR*400核磁共振仪,核磁共振条件:样品浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,溶剂 D_2O 。Thermo Nicolet Avatar 330 FT-IR,溴化钾压片。

1.1.3 实验动物 昆明种小鼠, δ ,体重 $18 \sim 20 \text{ g}$,由湖北省医学科学院医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2003-0005。

1.2 Ins(1,2,3)P3的制备^[6]

植酸水解用小麦麸皮植酸酶催化,当水解度达到50%时,水解液用717型强阴离子树脂吸附,用 $0.05 \sim 0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸进行线性梯度洗脱,将三磷酸肌醇对应组分用旋转蒸发仪在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 浓缩至无水时为止,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH中和至中性,冷冻干燥得固体,产品进一步用95%乙醇重结晶。纯度经HPLC检测大于99.5%。

1.3 四氧嘧啶糖尿病动物模型的建立

取实验小鼠分笼,标记,称重。禁食不禁水24 h后按 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量ip四氧嘧啶,72 h后断尾取血,以空腹血糖值大于 $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小鼠,且连续出现多食、多饮、多尿症状者为DM(糖尿病)小鼠模型。

1.4 Ins(1,2,3)P3对正常小鼠血糖影响

取实验小鼠,随机分为2组,每组12只分别为正常对照组(normal control,注射生理盐水)、Ins(1,2,3)P3组。连续腹腔注射生理盐水或Ins(1,2,3)P3 12 d,Ins(1,2,3)P3的钠盐用生理盐

水配制成 $1.0 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 的浓度,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调pH为7.0,给药量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。末次给药后,所有动物禁食不禁水12 h,眼眶取血,血液以 $3\ 600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离,取上层液得小鼠血清,按试剂盒说明方法测定血糖。

1.5 Ins(1,2,3)P3对正常小鼠免疫器官的影响

正常小鼠分两组,每组小鼠共12只,Ins(1,2,3)P3组ip给药,正常对照组注射生理盐水,连续12 d后处死,取胸腺、脾称重,计算各脏器指数。

1.6 Ins(1,2,3)P3对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用

每组小鼠共12只,分别进行标记,笼养,共5组,分别为模型对照组(DM小鼠只注射等量生理盐水),阳性对照(PHF)组(盐酸苯乙双胍治疗 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),Ins(1,2,3)P3低剂量,中剂量,高剂量组;低剂量,中剂量,高剂量组分别腹腔注射 0.2 mL Ins(1,2,3)P3的钠盐 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,Ins(1,2,3)P3的钠盐用生理盐水配制,pH为7.0。模型对照组注射等量生理盐水 0.2 mL 。连续12 d ip给药。期间自由饮水和摄食,每日观察动物进食、饮水、尿量、皮毛、活动等生长情况。末次给药后,所有动物禁食12 h,称重,眼眶取血,血液以 $3\ 600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离,取上层清液得小鼠血清,按试剂盒说明方法测定血糖。取血后,立即用颈椎脱臼方法处死动物,取脾、胸腺并称重。

1.7 统计学分析

用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS软件进行t检验和方差分析。

2 结果

2.1 三磷酸肌醇的结构

所得三磷酸肌醇光谱学数据如下:IR(KBr), ν, cm^{-1} : 3 432.66(O-H), 1 638.93(O-H的半峰), 1 116.64(C-O), 975.67(O-P); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ : 3.174(t, 1H, H5), 3.678(t, 2H, H4, H6), 3.832(t, 2H, H1, H3), 4.951(d, 1H, H2), $^1\text{H-NMR}$ 与文献基本一致^[7]; MS, m/e(%): 530.8(28.76%) [$\text{InsP}_3\text{Na}_5 + \text{H}$]⁺, 508.8(29.82%)为 [$\text{InsP}_3\text{Na}_4 + \text{H}$]⁺, 因此产物为Ins(1,2,3)P3。

2.2 Ins(1,2,3)P3对正常小鼠血糖的影响

实验小鼠连续ip Ins(1,2,3)P3 12 d,末次给药后,所有动物禁食不禁水12 h,眼眶取血。测血清中血糖值,所得结果见表1。各组小鼠的血糖水平没有显著差异($P > 0.05$)。说明Ins(1,2,3)P3对

正常小鼠来说,并不具有降血糖作用。

表 1 Ins(1,2,3)P3 对正常小鼠血糖的影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of Ins(1,2,3)P3 on blood glucose of normal mice ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖/mm \cdot L $^{-1}$
正常对照组	6.14 \pm 0.94
Ins(1,2,3)P3 组	6.04 \pm 0.86

2.3 Ins(1,2,3)P3 对正常小鼠免疫器官的影响

与对照组相比,腹腔注射 Ins(1,2,3)P3 (100 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$) 12 d 后,免疫器官均有所增重,其中脾指数极显著高于对照,说明 Ins(1,2,3)P3 能增强正常小鼠免疫功能。结果见表 2。

表 2 Ins(1,2,3)P3 对正常小鼠免疫器官的影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Ins(1,2,3)P3 on immune function of normal mice ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	胸腺指数/mg \cdot g $^{-1}$	脾指数/mg \cdot g $^{-1}$
正常对照	2.92 \pm 0.71	3.19 \pm 0.72
Ins(1,2,3)P3 组	3.24 \pm 0.83 ¹⁾	4.17 \pm 0.69 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note:Compared with normal control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

2.4 Ins(1,2,3)P3 对四氧嘧啶糖尿病小鼠免疫器官的影响

糖尿病小鼠连续 12 d ip 给药,取血后,立即用颈椎脱臼方法处死动物,取脾、胸腺并称量。结果见表 3。

表 4 Ins(1,2,3)P3 对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of Ins(1,2,3)P3 on blood glucose of DM mice ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$	个数	血糖(始)/mm \cdot L $^{-1}$	血糖(终)/mm \cdot L $^{-1}$	降低率/%
模型对照组		11	21.56 \pm 3.21	22.37 \pm 3.45	-3.76
阳性对照(PHF)组	70	12	21.89 \pm 3.82	13.21 \pm 3.17 ²⁾	39.65
Ins(1,2,3)P3 组	10	12	21.86 \pm 3.12	19.23 \pm 2.56	12.03
	50	12	21.74 \pm 2.81	18.32 \pm 2.47 ¹⁾	15.73
	100	12	21.38 \pm 3.46	14.18 \pm 3.12 ¹⁾	33.67

注:与模型对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note:Compared with model control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

由表 4 可见,Ins(1,2,3)P3 的具有降低四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖功能。而且存在剂量-效应关系,剂量大时,效果较好。但与阳性对照(PHF)组相比较,Ins(1,2,3)P3 的降血糖功能比盐酸苯乙双胍差。而且实验也发现,糖尿病小鼠经治疗后,饮水量减少,尿量减少,毛色比较光亮,精神也较好,而对照组小鼠还发生了死亡现象。

3 讨论

实验研究表明,Ins(1,2,3)P3 能增强小鼠免疫

表 3 Ins(1,2,3)P3 对四氧嘧啶糖尿病小鼠免疫器官的影响 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of ins(1,2,3)P3 on immune function of alloxan-induced DM mice ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$	胸腺指数/ mg \cdot g $^{-1}$	脾指数/ mg \cdot g $^{-1}$
模型对照组		1.36 \pm 0.45	1.41 \pm 0.50
阳性对照(PHF)组	70	1.48 \pm 0.49	1.53 \pm 0.39
Ins(1,2,3)P3 组	10	1.39 \pm 0.38	1.64 \pm 0.30
	50	1.48 \pm 0.36	2.14 \pm 0.44 ²⁾
	100	1.68 \pm 0.44 ¹⁾	2.24 \pm 0.43 ²⁾

注:与模型对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note:Compared with model control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

胸腺与脾脏是生物体内重要的免疫器官,在生物体抵抗外来致病因数中起着十分重要的重要,胸腺指数或脾脏指数是指胸腺或脾脏的重量与小鼠体重的比值,一般来说,胸腺指数或脾脏指数大表示生物体抵抗力强。从表 3 中糖尿病小鼠胸腺指数与脾脏指数可以看出,模型对照组小鼠的脾脏指数极显著低于 Ins(1,2,3)P3 高剂量组 ($P < 0.01$)。模型对照组小鼠的胸腺指数显著低于 Ins(1,2,3)P3 高剂量组 ($P < 0.05$)。

2.5 Ins(1,2,3)P3 对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用

糖尿病小鼠连续 12 d ip 给药,末次给药后,所有动物禁食 12 h,眼眶取血,血液离心后所得血清用血糖试剂盒测血糖,结果见表 4。

功能,而糖尿病小鼠的免疫器官会受到很大破坏,因此 Ins(1,2,3)P3 降血糖功能可能与其提高小鼠的免疫功能有关,另外,文献表明 Ins(1,2,3)P3 具有抗氧化作用^[4],而体内自由基过剩是生物体生理功能紊乱的一个主要原因之一,因此 Ins(1,2,3)P3 降血糖功能可能与其抗氧化功能也有关。

Ins(1,4,5)P3 及其受体在生物体内发挥着重要的生理功能,Ins(1,4,5)P3 与其特异性受体(IP3R)结合后介导细胞内 Ca²⁺ 释放,Ca²⁺ 是细胞内

一种重要的第二信使,已公认 Ca^{2+} 在胰岛素信号传导途径中发挥一定作用,适宜的细胞内钙离子浓度是胰岛素正常发挥的一个重要环节。笔者所制 Ins(1,2,3)P3 的结构与生物体内固有的 Ins(1,4,5)P3 不同,在机体内 Ins(1,2,3)P3 也许会与 Ins(1,4,5)P3 竞争结合三磷酸肌醇特异性受体(IP3R)。从而调节 Ca^{2+} 通路,达到调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的效果。从而调节胰岛活力而减轻糖尿病症状,是否因为这一原因而起作用值得进一步研究。

REFERENCES

- [1] HOLUB B J. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids[J]. *Ann Rev Nutr*,1986,6:563-597.
- [2] LEE S H, PARK H J, CHO S Y, et al. Effects of dietary phytic acid on serum and hepatic lipid levels in diabetic KK mice[J]. *Nutr Res*,2005,25(9):869-876.
- [3] LEE S H, PARK H J, CHUN H K, et al. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice [J]. *Nutr Res*,2006,26(9):474-479.
- [4] BRIAN Q P, ERNST G. Antioxidant function of inositol 1,2,3-triphosphate and inositol 1,2,6-triphosphate[J]. *Free radic Biol Med*,1997,22(6):939-946.
- [5] HONG H, WANG Q M, ZHAO Z P, et al. Studies on antidiabetic effects of cortex Moutan polysaccharide-2b in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*,2003,38(4):255-259.
- [6] JIANG H, MA J Z, WU M C. Study on producing inositol triphosphate through the phytase extraction of wheat bran [J]. *Food Sci(食品科学)*,2004,6(25):124-126.
- [7] PHILLIPPY B Q, WHITE K D, JOHNSTON M R. Preparation of inositol phosphates from sodium phytate by enzymatic and nonenzymatic hydrolysis [J]. *Anal Biochem*,1987,12(162):151-121.

收稿日期:2008-01-28