

文章编号:1001-6880(2014)7-1103-06

# 海带多糖对糖尿病小鼠降钙素受体样受体表达的影响

帅 莉<sup>1</sup>,李晓丹<sup>2</sup>,郭瑜璇<sup>3</sup>,郭云良<sup>2\*</sup>,段德麟<sup>4</sup>,董永阳<sup>5</sup><sup>1</sup>青岛大学化学与环境工程学院,青岛 266071; <sup>2</sup>青岛大学中西医结合中心,青岛 266021; <sup>3</sup>河海大学海洋科学系,南京 210098; <sup>4</sup>中国科学院海洋研究所,青岛 266071; <sup>5</sup>山东海芝宝科技有限公司,威海 264300

**摘要:**探讨海带多糖对实验性 2 型糖尿病小鼠降钙素受体样受体(CrLR)表达的影响及其降糖作用的研究。健康雄性昆明小鼠 40 只,高脂饲料喂养并腹腔注射四氧嘧啶建立 2 型糖尿病模型,海带多糖灌胃干预治疗。自动血糖仪检测小鼠空腹血糖(FBG)水平,免疫组织化学和 Western blot 检测脑干、肝脏和胰腺组织中 CrLR 蛋白表达,RT-PCR 检测 CrLR mRNA 表达。经海带多糖治疗后,动物血清空腹 FBG 水平较模型组显著降低( $P < 0.05$ ) ;肝脏和胰岛细胞 CrLR mRNA 及其蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。实验表明海带多糖可能通过提高肝脏和胰岛细胞 CrLR 表达,减轻胰岛素抵抗,发挥降糖作用。

**关键词:**海带多糖;2 型糖尿病;胰淀素;降钙素受体样受体;小鼠

中图分类号:R93

文献标识码:A

## Effect of *Laminaria japonica* Polysaccharide on the Expression of Calcitonin Receptor-like Receptor in Diabetes Mellitus Model Mice

SHUAI Li<sup>1</sup>, LI Xiao-dan<sup>2</sup>, GUO Yu-xuan<sup>3</sup>, GUO Yun-liang<sup>2\*</sup>, DUAN De-lin<sup>4</sup>, DONG Yong-yang<sup>5</sup><sup>1</sup> School of Chemistry and Environment Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China; <sup>2</sup> Institute of Integrative Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, China; <sup>3</sup> Department of Oceanology, Hehai University, Nanjing 210098, China; <sup>4</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;<sup>5</sup> Shandong Haizhibao Science and Technology Co. Ltd., Weihai 264300, China

**Abstract:** To investigate the effect of *Laminaria japonica* polysaccharide (LJPS) on the expression of calcitonin receptor-like receptor (CrLR) and the hypoglycemic effect on type 2 diabetes mellitus mice. Type 2 diabetes mellitus mouse model was established by feeding high fatty forage and injecting alloxan intraperitoneally in 40 healthy male mice and treated with LJPS orally. The level of fasting blood glucose (FBG) was detected by automatic blood glucose device. The expression of CrLR was determined by immunohistochemistry and Western blot, and the expression of CrLR mRNA was detected by RT-PCR. After treated with *L. japonica*, the serum level of FBG were decreased significantly compared with that of model group ( $P < 0.05$ ). In the liver and pancreas, the expression levels of CrLR mRNA and CrLR protein were significantly higher than those in model group ( $P < 0.05$ ). This experiment showed that LJPS played a hypoglycemic effect by promoting the expression of CrLR in liver and pancreatic tissue to lessen insulin resistance (IR).

**Key words:** *Laminaria japonica* polysaccharide; type 2 diabetes; amylin; calcitonin receptor-like receptor; mice

胰淀素(Amylin)是胰岛  $\beta$  细胞分泌的由 37 个氨基酸残基组成的肽类激素<sup>[1]</sup>,与胰岛素共同贮存在胰岛  $\beta$  细胞的分泌颗粒,以 1:100 比例相伴释放到胰岛  $\beta$  细胞外<sup>[2]</sup>。胰淀素受体(Amylin receptor, AR)由降钙素受体(CTR)与受体活性修饰蛋白(RAMPs)异源二聚体组成。RAMP 有三种亚型,可

与降钙素基因相关肽(CGRP)、CTR 及降钙素受体样受体(Calcitonin receptor-like receptor, CrLR)结合形成肾上腺髓质素受体和胰淀素受体,在神经系统、胰腺、骨骼肌等均有表达<sup>[3]</sup>。由于胰淀素受体独立基因编码尚未确定<sup>[4]</sup>,胰淀素又是 CGRP 家族成员,因此可以 CrLR 作为胰淀素受体的成分<sup>[5]</sup>。研究发现,CrLR 在中枢神经系统<sup>[6]</sup> 和肝脏<sup>[7]</sup> 均有表达,CTR、CrLR 和 RAMPs 在胰岛  $\beta$  细胞上同时存在<sup>[8]</sup>,通过生成胰淀素受体并转移至细胞表面影响葡萄糖代谢<sup>[9]</sup>。海带(*Laminaria japonica*)性寒、味咸,有软

收稿日期:2013-09-26 接受日期:2014-02-17

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAB01B00/2013BAB01B01),广东省-中科院合作项目(2012B09040028)

\* 通讯作者 Tel:86-532-82991711; E-mail:guoqdsd@163.com

坚散结、利水功效<sup>[10]</sup>,其主要有效成分海带多糖具有抗氧化<sup>[11]</sup>、抗凝<sup>[12]</sup>、降血脂血糖<sup>[13,14]</sup>等作用。本课题组前期研究表明,海带可通过增强机体的抗氧化作用<sup>[15]</sup>,降血脂作用<sup>[16]</sup>,促进胰岛细胞分泌功能恢复而发挥降血糖作用<sup>[17]</sup>,但对于胰淀素受体表达的影响报道甚少<sup>[18]</sup>。本实验旨在研究海带多糖对2型糖尿病小鼠胰淀素受体表达的影响,探讨其辅助降血糖作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康清洁级雄性昆明小鼠40只(23~27 g),购于青岛市药物检验所动物中心[SCXK(鲁)20110010]。普通饲料适应性喂养1周,随机取10只为对照组。其余30只高脂饲料喂养4周,然后腹腔注射四氧嘧啶建立2型糖尿病小鼠模型<sup>[18,19]</sup>。四氧嘧啶用生理盐水配制成溶液(2.5 g/L)腹腔注射(50 mg/kg),隔日1次,连续3次,对照组同步注射等量的生理盐水。末次注射后第3 d,剪尾采血检测空腹血糖(FBG)水平,以FBG大于对照组均数2个标准差为2型糖尿病模型成功的标志。将血糖未达标准的10只动物剔除,成功的20只模型再随机分为模型组10只和治疗组10只。

### 1.2 试剂

四氧嘧啶(Cat No. A8050,索莱宝科技)。海带多糖由中国科学院海洋研究所提供,占原始海带的17.9%,由中国科学院海洋研究所提供。兔抗小鼠CrlR一抗(Se-30028)由Santa Cruz提供。免疫组化试剂盒(SP-90001,中杉)。组织裂解液(No. P0013,碧云天生物研究所)。GAPDH(TA-08,中杉)。加过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam,Ab6721),辣根酶标记山羊抗小鼠lgG(ZB-2305)。Trizol试剂(Invitrogen公司)。Takara DRR014A PrimeScript? RT-PCR Kit。

### 1.3 仪器与设备

自动血糖仪(强生医疗器械有限公司)检测血糖(mmol/L)。TC-120型智能程控生物组织自动脱水机,TB-718E生物组织自动包埋机,TB-718L生物组织包埋机(冷台)均由泰维科技公司制造。Leica RM2015石蜡切片机由德国徕卡公司制造。Vilber Fusion FX7成像系统。紫外分光光度计(K5500,北京凯奥科技公司)。

### 1.4 干预措施

用生理盐水配制海带多糖,根据前期研究<sup>[18,19]</sup>所得的有效剂量(3.00 g/kg)灌胃治疗,每日1次,连续2周。对照组和模型组同步给予等量生理盐水。

### 1.5 检测指标

#### 1.5.1 空腹血糖(FBG)检测

治疗结束后,动物禁食12 h,次日清晨以10%水合氯醛(16 mL/kg)腹腔注射麻醉,经心脏采血1.0 mL,4000 rpm离心10 min分离血清,-20 ℃保存备用。

#### 1.5.2 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡至水,滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育10 min,蒸馏水洗5 min×3次。滴加试剂A室温孵育10 min,PBS洗5 min×3次,加CrlR一抗(1:500),37 ℃孵育1 h,PBS洗5 min×3次。滴加试剂B,37 ℃室温孵育15 min,PBS洗5 min×3次。滴加试剂C,37 ℃孵育10 min,PBS洗3 min×3次。DAB显色,苏木精复染,显微镜下观察细胞浆或细胞膜出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,部分切片不加一抗,用0.1 mol/L PBS代替染色,不出现阳性着色。在400倍光镜下随机观察5个不重叠的视野,Image-Pro Plus软件分析组织CrlR吸光度值(A),以阳性细胞A减去背景A表示CrlR表达强度,取其均值。

#### 1.5.3 Western blot检测

CrlR蛋白表达:每组取5只小鼠用生理盐水45 mL经心脏灌注后,取脑干50 mg、肝脏100 mg、胰腺100 mg提取总蛋白。将组织块置匀浆器中剪碎,加1 mL细胞裂解液(500 μL裂解液+5 μL PMSF, No. P0013,碧云天生物研究所)充分研磨(冰上操作)。收集组织匀浆至1.5 mL离心管,4 ℃冷冻离心机(Eppendorf 5801,德国)12000 rpm离心15 min,取上清置于1.5 mL离心管,BCA试剂盒(P0010,碧云天生物研究所)测定蛋白浓度。取总蛋白50 μg,8% SDS-PAGE电泳分离CrlR蛋白,转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h。然后加一抗(CrlR 1:500,GAPDH,TA-08,1:10000),4 ℃孵育过夜,TBST洗涤10 min×3次。加过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam,Ab6721,1:5000),辣根酶标记山羊抗小鼠lgG(ZB-2305,1:10000),37 ℃孵育1 h。取出膜用TBS洗涤10 min×3次,TBS洗涤5 min×2次。按1:1加A、B液显影,Vilber Fusion FX7系统成像,Quantity One软件图像分析。以目的蛋白CrlR

(53kD)与内参 GAPDH (36kD)灰度值的比值表示 CrlR 的相对含量,重复测定 3 次,以均数±标准差表示。

#### 1.5.4 RT-PCR 检测

CrlR mRNA 丰度:应用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA。取脑干 50 mg、肝脏 100 mg、胰腺 100 mg,剪碎置于离心管。加 1 mL Trizol 溶液研磨,混匀 10 s,室温静置 5 min。加 0.2 mL 氯仿,振荡混匀 15 s,室温静置 5 min,4 °C 12000 rpm 离心 15 min。取无色水相置另一 EP 管,加 0.5 mL 异丙醇,混匀,静置 10 min,4 °C 12000 rpm 离心 15 min。弃上清,加 75% 预冷乙醇 1 mL,振荡洗涤 RNA,4 °C 7500 rpm 离心 5 min。弃上清,通风橱干燥 20 min (至 RNA 沉淀变透明)后,加 0.1% DEPC · H<sub>2</sub>O 100 μL,置 57 °C 水浴 10 min,溶解 RNA。紫外分光光度计(K5500,北京凯奥科技公司)测 RNA 丰度。应用 Primer Premier 5.0 设计引物(上海英潍捷基有限公司合成)。CrlR 上游引物 5'-GGT ACC ACT ACT TGG CAT TG-3',下游引物 5'-GTC ACT GAT TGT TGA CAC TG-3',产物长度 262 bp;GAPDH 上游引物 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3',产物长度

452 bp。应用 Takara DRR014A PrimeScript™ RT-PCR Kit 扩增基因:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,退火(CrlR 56 °C,GAPDH 60 °C)30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取扩增产物 10 μL,2% 琼脂糖凝胶电泳(110V/40A)30 min,溴化乙锭染色,Vilber Lourmat 系统成像,Quantity One 软件分析 PCR 产物条带灰度值。以目的基因与内参 GAPDH 灰度值的比值表示 CrlR 基因的相对丰度。重复测定 3 次,以均数±标准差表示。

#### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用方差分析,组间两两比较用 LSD-t 检验。

## 2 实验结果

### 2.1 海带多糖对糖尿病小鼠 FBG 水平的影响

造模前,各组动物 FBG 水平均无明显差异( $P > 0.05$ )。造模后(治疗前),各组动物 FBG 水平均有显著性差异( $F = 14.32, q = 0.01 \sim 1.57, P < 0.05$ ),模型组显著高于对照组( $t = 2.64, P < 0.05$ )。治疗组动物 FBG 水平显著低于模型组( $F = 4.02, q = 0.01 \sim 2.94, P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 治疗前后血清 FBG 水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$ )

Table 1 FBG levels before and after treatment of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$ )

分组 Group	造模前 Before modeling	造模后(治疗前) After modeling	治疗后 After treatment
对照组 Control group	7.40 ± 1.23	6.70 ± 1.05	6.19 ± 1.27
模型组 Model group	7.40 ± 1.23	10.18 ± 0.97 <sup>a</sup>	8.47 ± 0.91 <sup>b</sup>
治疗组 Treatment group	7.40 ± 1.23	9.95 ± 1.03 <sup>a</sup>	6.86 ± 1.46 <sup>c</sup>

a:与造模前比较, $P < 0.05$ ;b:与对照组比较, $P < 0.05$ ;c:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

a: compared with before modeling,  $P < 0.05$ ; b: Compared with control group,  $P < 0.05$ ; c: compared with model group,  $P < 0.05$ .

### 2.2 海带多糖对糖尿病小鼠脑干、肝脏和胰腺组织 CrlR 表达的影响

免疫组化结果显示,脑干组织 CrlR 表达水平在对照组、模型组和治疗组之间均无显著性差异( $P >$

0.05)。肝脏和胰腺组织中,模型组 CrlR 表达水平较对照组显著降低( $P < 0.05$ )。治疗组 CrlR 阳性着色均较模型组明显增强( $P < 0.05$ )。见图 1。

表 2 各组小鼠在不同组织 CrlR 表达( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Expressions of CrlR in different tissues of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

分组 Groups	降钙素受体样受体-脑干 CrlR-B	降钙素受体样受体-肝脏 CrlR-L	降钙素受体样受体-胰腺 CrlR-P
对照组 Control group	0.293 ± 0.018	0.192 ± 0.014	0.149 ± 0.026
模型组 Model group	0.269 ± 0.017	0.131 ± 0.013 <sup>△a</sup>	0.102 ± 0.008 <sup>△b</sup>
治疗组 Treatment group	0.272 ± 0.014	0.175 ± 0.009 <sup>▲a</sup>	0.127 ± 0.015 <sup>▲b</sup>

注:与对照组比较,<sup>△a</sup> $t = 25.39$ ,<sup>△b</sup> $t = 8.53, P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>▲a</sup> $t = -15.63$ ,<sup>▲b</sup> $t = -5.82, P < 0.05$ 。

Note: Compared to control group,<sup>△a</sup> $t = 25.39$ ,<sup>△b</sup> $t = 8.53, P < 0.05$ ; Compared to model group,<sup>▲a</sup> $t = 15.63$ ,<sup>▲b</sup> $t = 5.82, P < 0.05$ .

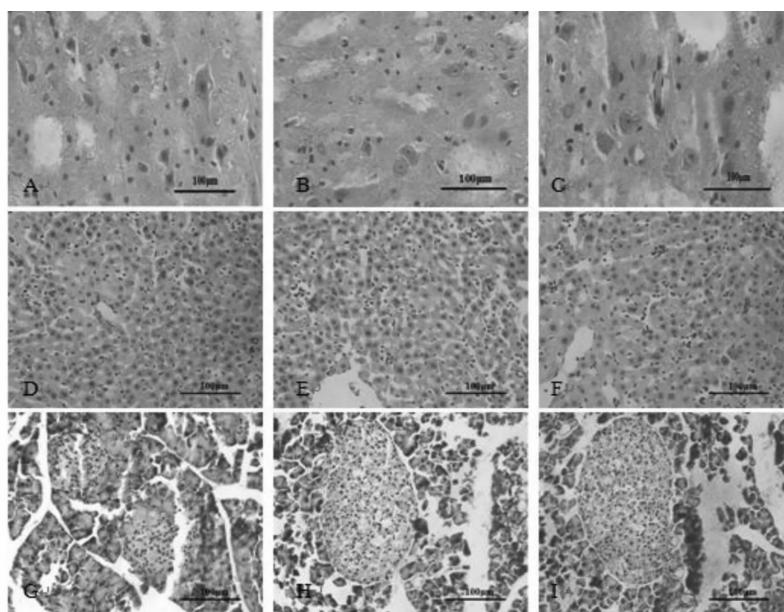


图 1 小鼠脑干、肝脏和胰腺组织 CrlR 表达, IC  $\times 400$

Fig. 1 Expressions of CrlR in brainstem, liver and pancreatic tissue of mice, IC  $\times 400$

A-C: 脑干对照组、模型组、治疗组; D-F: 肝脏对照组、模型组、治疗组; G-I: 胰腺对照组、模型组、治疗组

A-C: Brainstem (control, model and treatment groups); D-F: Liver (control, model and treatment groups); G-I: Pancreas (control, model and treatment groups)

## 2.3 海带多糖对糖尿病小鼠脑干、肝脏和胰腺组织 CrlR 蛋白水平的影响

Western blot结果显示,对照组、模型组和治疗组小鼠脑干CrlR蛋白表达水平比较均无显著性差异( $P > 0.05$ )。模型组肝脏和胰腺CrlR蛋白表达水较对照组均显著降低( $P < 0.05$ ),治疗组肝脏胰腺CrlR蛋白表达水平较模型组均显著升高( $P < 0.05$ )。见图2。

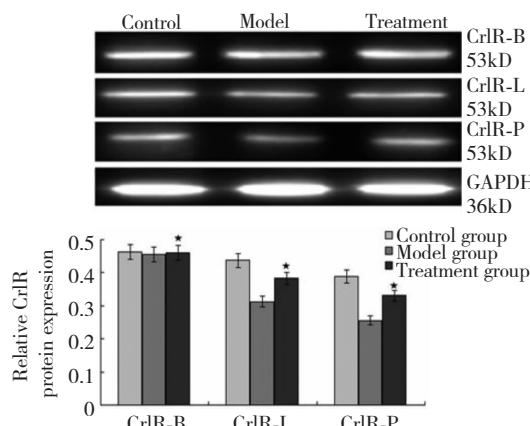


图 2 各组不同组织中 CrlR 蛋白表达变化

Fig. 2 Expressions of CrlR protein in different tissues of mice

CrlR-B: 脑干; CrlR-L: 肝脏; CrlR-P: 胰腺

CrlR-B: Brainstem; CrlR-L: Liver; CrlR-P: Pancreas

## 2.4 海带多糖对糖尿病小鼠脑干、肝脏和胰腺组织 CrlR mRNA 水平的影响

RT-PCR结果显示,脑干CrlR mRNA表达水平各组之间比较均无显著性差异( $P > 0.05$ )。模型组肝脏和胰腺组织CrlR mRNA表达水较对照组均显著降低( $P < 0.05$ ),治疗组肝脏和胰腺CrlR mRNA表达水平较模型组均显著升高( $P < 0.05$ )。见图3。

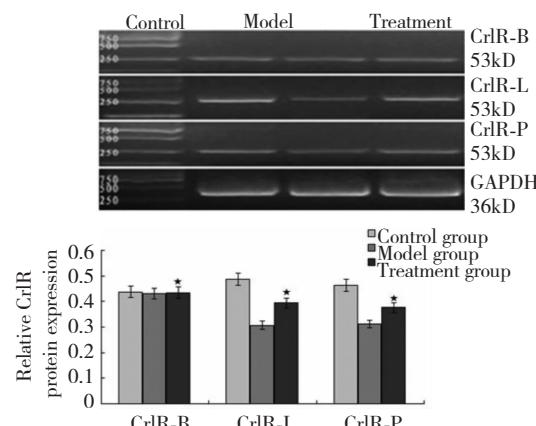


图 3 各组不同组织中 CrlR mRNA 表达变化

Fig. 3 Expression of CrlR mRNA in different tissues of mice

m: DL2,000DNA Marker; CrlR-B: 脑干; CrlR-L: 肝脏; CrlR-P: 胰腺

CrlR-B: Brainstem; CrlR-L: Liver; CrlR-P: Pancreas

### 3 讨论

2型糖尿病是代谢性疾病,其主要特征为胰岛素抵抗(IR),相对胰岛素缺乏和高血糖。胰淀素由胰岛细胞分泌进入血液后,随血液循环到达全身各组织,与靶组织细胞膜胰淀素受体结合,发挥生理效应。研究报道<sup>[4]</sup>,胰淀素与受体结合后可以调节胃排空速率,抑制餐后胰高血糖素的分泌,减少肝糖原储存量,抑制摄食中枢,影响骨的吸收和形成<sup>[20]</sup>。胰淀素能抑制消化酶分泌<sup>[21]</sup>。血胰淀素浓度无论是通过注射急剧升高<sup>[22]</sup>,还是通过喂饲缓慢升高<sup>[23]</sup>,都使进食的频率和数量明显减少,从而使餐后血糖得到很好的控制。Grunberger<sup>[24]</sup>研究治疗2型糖尿病的新药普兰林肽是一种合成胰淀素类似物,用来解决胰淀素缺乏问题。抑制胃排空和胰高血糖素的分泌是临幊上普兰林肽联合胰岛素治疗1型糖尿病和2型糖尿病的理论基础<sup>[25]</sup>。本实验证实,模型组动物FBG水平显著升高,局灶性肝细胞和胰岛细胞空泡变性,说明2型糖尿病小鼠胰岛β细胞受损,胰岛素分泌功能下降。组织病理学,免疫组化法,RT-PCR及Western blot实验证实,脑干组织CrlR mRNA及其蛋白表达水平各组间相比较无显著性差异,提示脑组织中CrlR不受血糖等影响而保持其稳定性,对维持脑的生理功能的稳定性有重要意义。而在肝脏和胰腺组织,模型组CrlR mRNA及其蛋白表达水平较对照组均明显降低,表明2型糖尿病存在由CrlR数目的减少,受体敏感性下降而引起的胰岛素抵抗。经海带多糖治疗后,肝脏和胰腺组织CrlR表达水平显著升高,FBG水平明显下降,提示海带多糖可通过提高2型糖尿病小鼠肝脏和胰腺组织CrlR表达,减轻胰岛素抵抗,改善2型糖尿病的糖代谢。

### 参考文献

- 1 Bailey RJ, Walker CS, Ferner AH, et al. Pharmacological characterization of rat amylin receptors: implications for the identification of amylin receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, 2012, 166:151-167.
- 2 Butler PC, Chou J, Carter WB, et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes*, 1990, 39:752-756.
- 3 Wang J(王静), Bian RW(卞茸文). Advance of the relation in amylin and insulin resistance. *Modern Med J*(现代医学), 2004, 33:59-62.
- 4 Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*. 2011, 91:795-826.
- 5 Flahaut M, Rossner BC, Frisov D. Respective roles of calcitonin receptor like receptor(CRLR) and receptor activity modifying proteins(RAMP) in cell surface expression of CRLR/RAMP heterodimeric receptors. *J Biol Chem*, 2002, 277:14731-1473.
- 6 Chen ZR(陈祖荣), Lin QQ(林秋泉), Feng H(冯华). The research progress on the relationship between Calcitonin gene-related peptide and cerebrovascular diseases. *China Prac*, 2009, 4:233-235.
- 7 Kroeger I, Erhardt A, Abt D, et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide(CGRP) prevents inflammatory liver injury in mice. *J Hepatol*, 2009, 51:342-353.
- 8 Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, et al. Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Mol Brain Res*, 2001, 931:36-45.
- 9 Martínez A, Kapas S, Miller M, et al. Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 2000, 141:406-411.
- 10 Sun LQ(孙立靖), Wang Y(王彦), Tai J(台杰), et al. Summary of studies on pharmacological effects of kelp. *Chin Pharm*(中国药业), 2009, 18(2):59-60.
- 11 Shuai L(帅莉), Xu XY(徐新颖), Guo YL(郭云良), et al. Study on the antioxidant effects of Laminaria japonica in hyperlipemia rats. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2010, 29(5):1-5.
- 12 Pereira MG, Benevides NMB, Melo MRS, et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? *Carbohydrate Research*, 2005, 340:2015-2023.
- 13 Long SH(龙少华), Li XD(李晓丹), Xu XY(徐新颖), et al. Hypoglycemic effect of laminaria japonica on diabetic model rats. *Chin J Information on TCM*(中国中医药信息杂志), 2011, 18(6):40-42.
- 14 Tian JW(田嘉伟), Long SH(龙少华), Li XD(李晓丹), et al. The effect of Laminaria japonica polysaccharide on lipids and leptin levels of hyperlipemia mice. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2012, 31(6):37-40.
- 15 Yu ZQ(于竹芹), Li XD(李晓丹), Xu XY(徐新颖), et al. The hypoglycemic effect of Laminaria japonica on diabetic model induced by alloxan in rats. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2011, 27:651-655.