氨基葡萄糖对 SD 大鼠肝脏糖代谢相关蛋白表达差异性的研究 *

蒲乾坤 周 催 车会莲△

(中国农业大学 北京 100083)

摘要 目的：研究氨基葡萄糖对 SD 大鼠肝脏中糖代谢相关蛋白表达的影响。**方法：**选取成年雌性 SD 大鼠 48 只，按体重随机分成 4 组，分别为氨基葡萄糖高、中、低剂量组和阴性对照组。分别灌胃 500mg/Kg，250mg/Kg，125mg/Kg 的氨基葡萄糖溶液和 1ml/100g 的生理盐水，连续灌胃 28 天。实验结束时处死试验动物，用免疫组织化学法检测肝脏中蛋白激酶，己糖激酶，一氧化氮合酶，葡萄糖转运蛋白 4 和葡萄糖转运蛋白 2 的表达情况。**结果：**试验期间各组动物生长发育情况良好，灌胃不同剂量氨基葡萄糖的大鼠肝脏中五种蛋白的表达与阴性对照组相比均无显著性差异(P≥ 0.05)。**结论：**氨基葡萄糖未导致肝脏中糖代谢相关蛋白表达的异常，提示服用氨基葡萄糖不会影响肝脏的糖代谢过程。

关键词：氨基葡萄糖；免疫组化；糖代谢相关蛋白

中图分类号：Q95-33，R322.47 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)09-1618-03

The Effects of Glucosamine on Related Proteins of Glucose Metabolism in Rats*

PU Qian-kun, ZHOU Cui, CHE Hui-lian△

(China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT Objective: To research the effects of glucosamine to glucose metabolism in liver through a 28-day feeding study with SD rats. Methods: Forty-eight adult rats were randomly divided into four groups by their weights: one H group, one M group, one L group and one C group. All rats were oral administrated with either normal saline or GlcN via gavage. The H group, M group, L group were fed GlcN of 500mg/Kg, 250mg/Kg, 125mg/Kg respectively and the C group were fed normal saline of 1ml/100g every day. The rats were fed for 28 days. At the end of the 28th day, five hepatic physiological indices of these rats were measured by immunohistochemistry. Results: During the experiment, conditions of rats in each group were good. The rats of H, M and L group had normal hepatic physiological indices and no organ tissue damage was detected. Conclusion: From the results of this 28 days feeding test, we can conclude that feed different doses of GlcN to rats will not affect the metabolism of glucose in their liver.

Key words: GlcN; Immunelhistochemistry; Related proteins of glucose metablism

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R322.47 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1618-03

氨基葡萄糖广泛存在于人和动物的软骨、肌腱和韧带等组织中[1]，并且还参与构成人体细胞膜，是蛋白多糖大分子合成的中间物质[2]。现代医学证实：适当补充氨基葡萄糖能降低骨关节炎或风湿性关节炎引起的关节肿胀、关节僵硬等症状[3]。口服一定量的氨基葡萄糖可以显著减轻膝关节的肿胀与炎症症状，且未见有对人体毒副作用的报道[1]。因此在国内外有不少患有骨关节疾病的老年人常年服用氨基葡萄糖产品。

氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN)是葡萄糖 2 号位碳原子上的一个羟基基团被氨基取代得到的化合物，比葡萄糖更加疏水[4]。氨基葡萄糖进入人体后，很快地进入各个组织器官，尤其是肝脏、肾脏和关节软骨等。由于肝脏的首过效应，被机体吸收的超过 70%的氨基葡萄糖通过氨基己糖通路被代谢，最终被代谢为蛋白聚糖[5]。近年来，糖尿病与动脉粥样硬化的患者不断增加。氨基葡萄糖与葡萄糖的代谢有共同的途径，而肝脏是葡萄糖代谢的主要器官，糖代谢紊乱可导致肝脏中糖代谢相关蛋白表达异常，与糖尿病、肥胖症等疾病的发生和发展有密切关系。目前关于氨基葡萄糖对葡萄糖代谢影响的报道较少，本实验正是通过研究灌胃不同剂量的氨基葡萄糖 28 天对 SD 大鼠肝脏中五种糖代谢相关指标的影响，研究氨基葡萄糖是否会影响葡萄糖代谢的主要器官 - 肝脏中的糖代谢过程，进而影响机体的糖代谢过程。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试物：纯度为 99.8%的氨基葡萄糖（购于 Sigma 公司）。

1.1.2 实验动物：购于北京维通利华实验动物技术有限公司的成年 SD 雌性大鼠 48 只，平均体重 180～220 g，适应性喂养 5 天后，按体重随机分成 4 组，每组 12 只。

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（30700662）

作者简介：蒲乾坤（1989-），男，在校本科生，E-mail：popo13@139.com

△通讯作者：车会莲（1977-），女，副教授，E-mail：chehuilian@cau.edu.cn

（收稿日期：2011-06-30 接受日期：2011-07-25）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3 饲养与管理 SPF 条件下，同组两只一笼喂养，自由进食和饮水。环境温度 21～25℃，相对湿度 40%～60%，空气循环 15 次 /h，每天照明时间为 8AM-20PM 时。每日观察并记录动物的生长及活动情况。按照 GB14924.3-2001[6]为实验动物大鼠配制饲料，经 Co60 辐射灭菌，使日粮达到清洁级水平。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及剂量设置 实验动物分成四组，分别为灌胃氨基葡萄糖高剂量组（H 组），中剂量组（M 组），低剂量组（L 组）和正常对照组（C 组）。各剂量如下：H 组：灌胃 500mg/Kg.d 的氨基葡萄糖；M 组：灌胃 250mg/Kg.d 的氨基葡萄糖；L 组：灌胃 125mg/kg.d 的氨基葡萄糖；C 组：灌胃 1ml/100g.d 的生理盐水。

1.2.2 蛋白检测 灌胃受试物 28 天后，解剖实验动物，取肝脏，福尔马林固定，常规制片，脱蜡和水化，用微波热修复方法对切片进行抗原修复后，采用两步免疫组化法分别检测肝脏组织中蛋白激酶(PKC)，己糖激酶(HXK1)，一氧化氮合酶(NOS2)，葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)和葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)的表达。其中所用的 PKC、NOS2 和 GLUT2 的一抗为兔抗人多克隆抗体，HXK1 的一抗为小鼠抗人单克隆抗体，GLUT4 的一抗为小鼠抗大鼠单克隆抗体，所有一抗均购于 Santa 公司，二抗为购于 Zymed 公司的通用型二抗。染色后用光学显微镜观察各种蛋白的表达情况，并用病理图像分析系统对其进行半定量分析。

1.3 数据收集与处理

1.3.1 信号强度 每张切片中肝细胞免疫组化阳性信号强度在光学显微镜下用传统目测的方法分为 5 级，分别为 0、1、2、3、4，其中：0 级：无阳性免疫反应信号；1 级：微弱阳性免疫反应信号（单纯肝脏汇管区小叶间胆管上皮细胞阳性者信号强度定为 1 级）；2 级：弱阳性免疫反应信号；3 级：中阳性免疫反应信号；4 级：强阳性免疫反应信号。

1.3.2 表达系数 将每张切片中显示阳性信号的肝细胞数量范围分为 4 级，系数分别为 0、1、2、3，其中：0＝未见明显阳性反应细胞；单纯肝脏汇管区小叶间胆管上皮细胞阳性者表达系数定为 0.51＝阳性细胞数在 30%之内；2＝阳性细胞数在 30%～60%之间；3＝阳性细胞数 >60%；最后得出免疫组化结果为信号强度× 表达系数。

1.3.3 数据处理方法 采用 SPSS 软件的 ANOVA 方法对数据进行统计分析，以 P≤ 0.05 为显著性差异。数据以平均值± 标准差的形式表示。

2 实验结果

2.1 日常状况

在 28 天的实验周期内，所有实验动物状态良好，营养状况正常，未出现死亡等中毒情况。

2.2 肝脏中各种物质的测定

由表 1 可知，实验末期，不同剂量的氨基葡萄糖对大鼠肝脏中不同糖代谢相关蛋白的表达影响与正常对照组相比差异均不显著(P≥ 0.05)。

表 1 末期各组实验动物肝脏中不同糖代谢相关蛋白的表达情况（n=12）

Table 1 Expression instance of different protein related sugar metabolism in experimental animal liver in telophase(n=12)

Groups	PKC	HXK1	NOS2	GLUT4	GLUT2
H	2.125± 0.720	0.375± 0.250	6.250± 0.058	3.000± 0.414	5.250± 0.113
M	3.750± 0.862	2.000± 0.779	5.250± 0.737	4.000± 0.243	7.750± 0.924
L	5.250± 0.737	3.125± 0.705	2.000± 0.828	1.750± 0.500	7.750± 0.315
C	5.500± 0.796	0.250± 0.289	6.000± 0.477	5.750± 0.872	1.500± 1.000

3 讨论

近年来，随着老龄化人口的增多，骨性关节炎患者的比例逐年增加，而中老年人群中患糖尿病的比例也远远高于其他年龄段[7]。氨基葡萄糖可参与体内的糖代谢，即有可能对体内的糖代谢过程造成影响，干扰糖代谢过程，进而导致胰岛素抵抗、糖尿病等疾病。糖代谢的紊乱还可能会引起脂类代谢紊乱，从而导致高脂血症、动脉粥样硬化、酮血症的发生。虽然目前还未见文献支持，但这种生理学潜在的危险不容忽视。这种被广泛应用的能够降低骨性关节炎肿胀、关节僵硬的氨基葡萄糖，能否用于糖尿病、高血脂患者，而不影响他们体内的糖代谢和脂代谢过程，尚需要利用动物模型和分子生物等手段进行更深入的研究。

近年来，关于氨基葡萄糖在人体中的药代动力学和生物利用度的研究常有报道[8,9]，氨基葡萄糖对骨关节炎的治疗机理也逐渐被学者探明[10,11]，但氨基葡萄糖在代谢过程中对肝脏的影响却少有深入研究。本实验经口给予 SD 大鼠不同剂量的氨基葡萄糖连续 4 周后，各组大鼠均未发现任何明显中毒症状，无死亡情况发生。结果表明，与阴性对照组相比，不同剂量氨基葡萄糖没有影响实验动物肝脏中五种蛋白的表达量(P≥ 0.05)，均未出现任何特异性肝脏病理改变。提示氨基葡萄糖在代谢过程中不会对肝脏的生理功能产生不良影响，对肝脏中与糖代谢相关的几种重要蛋白的表达亦无明显影响。这为氨基葡萄糖是否能够用于伴有关节炎的糖尿病、脂代谢异常患者减轻关节肿胀、关节僵硬等症状提供了一些的参考数据。

参 考 文 献 (References)

[1] J.W. Anderson, R.J. Nicolosi and J.F. Borzelleca. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(2): 187-201

[2] 赵广凯, 赵永德. D- 氨基葡萄糖含磷衍生物的合成与结构表征[D]. 河南大学硕士研究生毕业论文,2009: 1-2
Zhao Guang-kai, Zhao Yong-de. Synthesize and structure characterization of D - amido glucose phosphatic ramification[D]. Master graduation thesis of Henan university,2009: 1-2

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

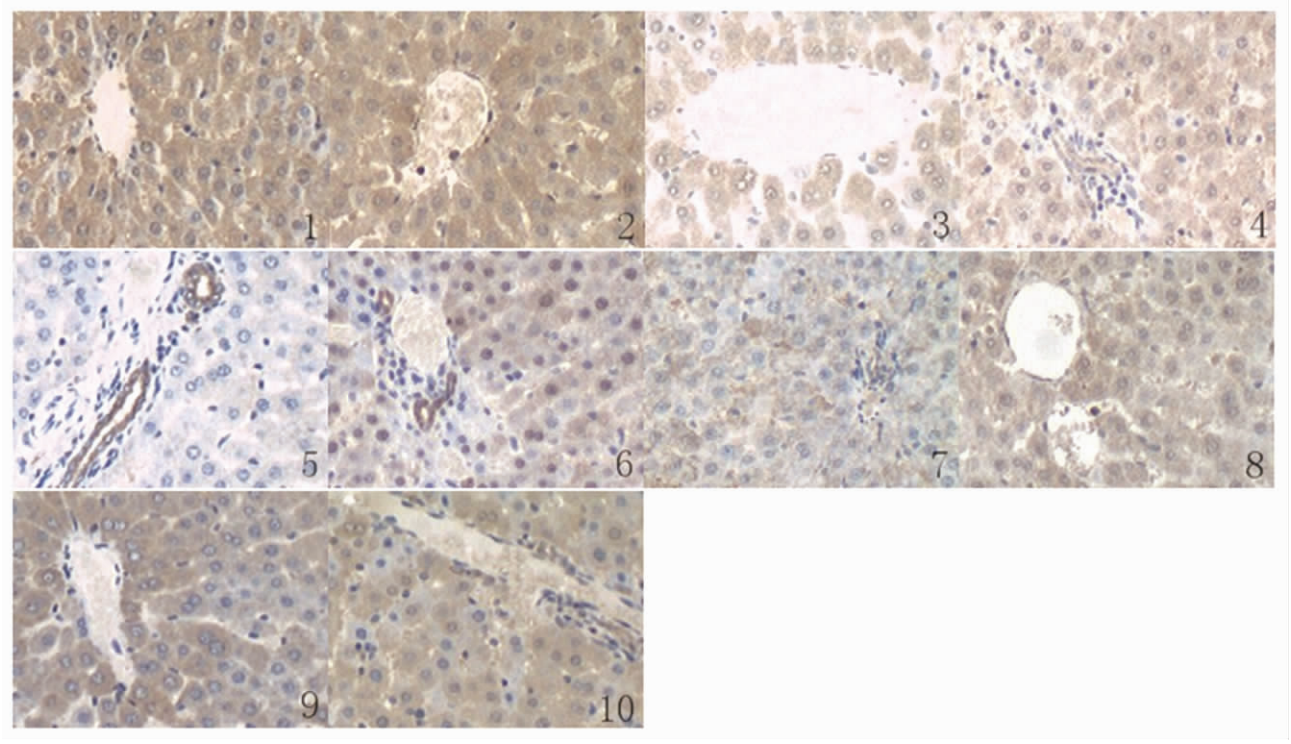

图 1 免疫组织化学染色检测肝脏组织中 GLUT2、GLUT4、PKC、HXK1 及 NOS2 的表达 (× 33)

Fig 1 The location of GLUT2、GLUT4、PKC、HXK1 and NOS2 in liver tissues with immunohischemical staining (× 33)**注：**1、3、5、7、9 **为** PKC、HXK1、NOS2、GLUT2、GLUT4 **在处理组肝脏组织中的表达；**2、4、6、8、10 **为** PKC、HXK1、NOS2、GLUT2、GLUT4 **在对照组肝脏组织中的表达**

Note: 1, 3, 5, 7, 9 are expressions of PKC, HXK1, NOS2, GLUT2, GLUT4 in liver tissue of treatment group; 2, 4, 6, 8, 10 are expressions of PKC, HXK1, NOS2, GLUT2, GLUT4 in liver tissue of control group.

[3] **钟洁珍, 林静吟. 骨关节炎治疗与氨基葡萄糖的关系** [J]. **广东药学**, 2005,15(2): 79-82

Zhong Jie-zhen, Lin Jing-ying. Relationship of osteoarthritis curing and amido glucose[J]. Canton Pharmacy, 2005,15(2): 79-82

[4] Paula JM, Jeremiah ES. Use of 3H-Glucosamine and 35S-Sulfate With Cultured Human Chondrocytes to Determine the Effect of Glucosamine Concentration on Formation of Chondroitin Sulfate [J]. Arthritis & Rheumatism, 2004, 50(11): 3574-3579

[5] **董振香. 葡立胶囊**[J]. **中国新药杂志**,2003,12(7): 572

Dong Zhen-xiang. Hydrochloric acid gelatine capsule [J]. Chinese Journal of New Drugs,2003,12(7): 572

[6] GB14924.3-2001, **实验动物小鼠大鼠配合饲料**[s].

GB14924.3-2001, Experimental animal rat and white rat mixed feed [s].

[7] Hawker G. Update on the epidemiology of the rheumatic diseases[J]. Current Opin Rheumatol, 1999, 69(38): 90-94

[8] **冷艳霞, 孙璐. 盐酸氨基葡萄糖片的相对生物利用度及其生物等效性评价**[J]. **沈阳药科大学学报**,2006,23(1): 6-9,37

Leng Yan-xia, Sun Lu. Relative bioavailability and bioequivalence of glucosamine hydrochloride [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University,2006,23(1): 6-9,37

[9] **周燕文, 徐爱兰, 兰聪贤. 盐酸氨基葡萄糖颗粒在健康人体的药代动力学和相对生物利用度** [J]. **中国临床药理学杂志**,2008,24(6): 509-512

Zhou Yan-wen, Xu Ai-lan, Lan Cong-xian. Pharmacokinetics and relatively bioavailability of hydrochloric acid amido glucose grain in healthy human body [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2008,24(6): 509-512

[10] Nagaoka, M. Igarashi, J. Hua, Y. et al. Recent aspects of the anti-inflammatory actions of glucosamine [J]. Carbohydrate Polymers, 2010,04(7):187-201

[11] **郑昱新, 石印玉. 氨基葡萄糖治疗骨关节炎的现状**[J]. **中国中医骨伤科杂志**, 2005,13(5): 68-69

Zheng Yu-xin, Shi Yin-yu. Actuality of amido glucose curing osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopeics, 2005,13(5): 68-69

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net