

某食用白酒对大鼠血糖、胰岛素和胰高血糖素表达的影响^{*}

尹 丹, 梁文妹^{**}, 夏白娟, 李一欣, 李容蓉, 刘 昊, 王燕林

(贵州医科大学, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 探讨某品牌食用白酒对大鼠空腹血糖、胰岛 B 细胞表达胰岛素(Ins)、A 细胞表达胰高血糖素(Glu)的影响。方法: 正常成年雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为实验组(EG)和正常对照组(NCG); 实验组 30 只又分为 4 周组(4 w)及 12 周组(12 w), 每周组均分为低剂量组(L 组)、中剂量组(M 组)及高剂量组(H 组), 各实验组均有 5 只作正常对照; 实验组大鼠予相应剂量食用白酒灌胃, 每日 11:00 am 及 5:00 pm 各灌胃 1 次, 正常对照组不予处理; 分别于第 4 w 末及第 12 w 末测空腹血糖, 采用免疫组化 SABC 法、图像分析及形态计量法计数各组大鼠胰岛 Ins 阳性细胞和 Glu 阳性细胞、平均光密度值及面数密度值。结果: 各实验组大鼠空腹血糖水平与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 各实验组 Ins 阳性细胞和 Glu 阳性细胞的分布、数量及免疫染色强度与正常对照组比较未见明显变化; 与正常组比较, 各实验组 Ins 阳性细胞、Glu 阳性细胞平均光密度值差异无统计学意义($P > 0.05$), Ins 阳性细胞、Glu 阳性细胞的面数密度(N_A)差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 某品牌食用白酒灌胃, 在本实验设定的剂量和时程内, 大鼠血糖未见明显异常, 对胰岛 B 细胞表达 Ins 及 N_A 、胰岛 A 细胞表达 Glu 和 N_A 无明显影响。

[关键词] 食用白酒; 血糖; 胰岛素; 胰高血糖素; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R335.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)12-1285-05

Effects of Liquor on Blood Glucose, Ins Expression and Glu Expression in Pancreatic Islet of Rats

YIN Dan, LIANG Wenmei, XIA Baijuan, LI Yixin, LI Rongrong, LIU Hao, WANG Yanlin

(Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of liquor (38% vol) on fasting blood glucose, Ins expression in pancreatic islet B cells and Glu expression in pancreatic islet A cells and to offer certain theoretical basis for studying healthy and scientific drinking. **Methods:** Forty normal male adult SD rats were randomly divided into normal control group and experimental group. Experiment group (30 rats) were divided into 4 w group and 12 w group. The rats in different week group were further divided into low dose group (L group), middle dose group (M group) and high dose group (H group). There were 5 normal control rats in 4 w group and 12 w group respectively. The rats in experiment group received intragastric administration of liquor twice a day, one at 11:00 am and the other 5:00 pm, while the normal control group remain no special treatment. At the end of 4 weeks and 12 weeks, fasting blood glucose was detected. Pituitary glands were excised at the end of 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks. Immunohistochemical SABC, image analysis and morphometry methods were adopted to count Ins positive cells and Glu positive cells, mean optical density and N_A . **Result:** There was no significant differences in fasting blood glucose level between experiment group and normal control group

^{*} [基金项目] 贵州省教育厅“125”重大科技专项[黔教合重大专项字(2012)007]

^{**} 通信作者 E-mail: wenmeiliang@126.com

网络出版时间: 2015-11-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151116.2227.012.html>

($P > 0.05$). Immunohistochemistry result showed that under the light microscope, the immunoreactive products of Glu positive cells and Ins positive cells were all brown particles in the cytoplasm. Morphological measurement results showed that there was no significant differences in the mean density and NA of Ins positive cells and Glu positive cells between experiment group and normal control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The administration by gavage of this brand liquor (38% vol) with the dosage and the time period in this experiment has no significant effect on fasting blood glucose, Ins expression in pancreatic islet B cells and Glu expression in pancreatic islet A cells of rats.

[**Key words**] liquor; blood glucose; insulin; glucagon; rats, Sprague-Dawley

中国是酿酒历史最悠久的国家之一,中国的白酒产业在国民经济中占有重要的位置^[1]。饮酒也是中国多民族长期生活不可或缺的习俗,与此同时,饮酒与健康关系日益受到人们关注。白酒中约 98% 是酒精和水,其余为非酒精成分,主要包括酯类化合物、醇类化合物、低分子有机酸、高分子有机酸、氨基酸及其微量元素等^[2-5]。酒精亦是一种常见的成瘾性物质,具有多种行为和神经生物学效应,也能引起一系列的生理反应^[6]。有报道指出,长期过量酒精摄入会破坏胰岛 B 细胞合成分泌 Ins^[7],但亦有人认为适量饮酒有益于血糖控制,降低糖尿病的发病率^[8-9]。本课题组的结果也表明,食用白酒在一定剂量范围及时程内,大鼠空腹血糖未见明显变化^[10]。血糖的调控主要依靠胰岛 B 细胞分泌的胰岛素 (Insulin, Ins) 及胰岛 A 细胞分泌的胰高血糖素 (Glucagon, Glu) 共同作用^[11]。本实验模拟正常人饮酒习惯制作动物模型,通过测定血糖、免疫组化 SABC 法、形态计量法,研究某食用白酒对大鼠空腹血糖、胰岛 A 细胞表达 Glu、胰岛 B 细胞表达 Ins 的影响,以期完善该饮用白酒的科学资料,并对健康适量饮酒提供基础实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型制作

健康成年雄性 SD 大鼠 40 只 (180 ~ 220 g/只),由贵州医科大学实验动物中心提供,适应性喂养 1 周后,按随机配对原则分为实验组 (experiment group, EG) 30 只,正常对照组 (normal control group, NCG) 10 只。实验组随机分为 4 周组 (4 w) 和 12 周组 (12 w) 各 15 只大鼠,4 w、12 w 又分为 3 个剂量组,即低剂量组 [Low dose group, L 组, 0.8 mL/(kg · d)]、中剂量组 [Middle dose group, M 组, 1.6 mL/(kg · d)] 及高剂量组 [High

dose group, H 组, 2.4 mL/(kg · d)]。实验组大鼠予某品牌 38 度食用白酒相应剂量灌胃,每日 11:00 am 及 5:00 pm 各灌胃 1 次,正常对照组不予处理。

1.2 取材和标本处理

分别在灌胃后第 4 w、12 w 末,大鼠尾尖取血测空腹血糖 (血糖仪及血糖试纸由强生医疗器械有限公司提供),按上述时间点处死动物,每个时间点取 5 只正常对照组大鼠同时处死,取胰腺尾部组织,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 连续切片,每例 3 张切片,切片间隔 56 μm 。

1.3 免疫组织化学 SABC 法

切片常规化蜡入水,10% 甲醇 - H_2O_2 ,羊血清 (1:10),滴加一抗。豚鼠抗 Ins 1:400 (海军总医院提供)、兔抗 Glu 1:6 000 (新西兰 Watpa 公司提供),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,羊抗兔 IgG (1:100),SABC 复合物 (1:100),DAB- H_2O_2 显色,苏木精复染细胞核,中性树脂封片。PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.4 图像分析及形态计量

随机取正常对照组及各实验组大鼠免疫组化切片 3 张,在 40 倍物镜下,每张切片用 BioMias 图像分析系统 (四川大学) 计数 5 个胰岛。用 Image pro plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 检测胰岛 B 细胞及 A 细胞的平均光密度,测量胰岛面积,计数有核胰岛 B 细胞及 A 细胞数,以胰岛组织作为参照体系,按下列公式分别求 Ins 及 Glu 阳性细胞面数密度 (个/4 000 μm^2): $N_A = N_x/A_r$, N_A 为面数密度, N_x 为计数有核阳性细胞总数, A_r 为计数胰岛组织的总面积^[12]。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件包对所得数据用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),所有的数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 空腹血糖

与正常对照组比较,各实验组大鼠空腹血糖检测未见明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠空腹血糖检测结果
Tab. 1 The test results of fasting blood-glucose of rats in each group

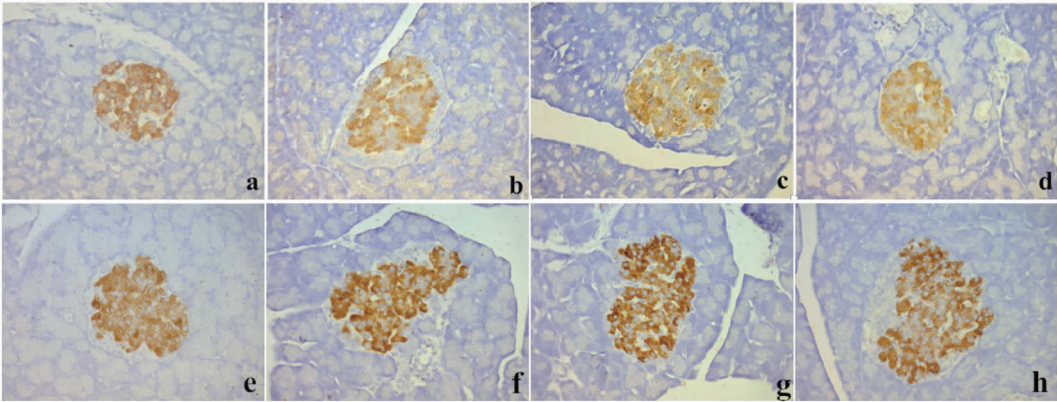
时间	空腹血糖 (mmol/L)			
	NCG 组	L 组	M 组	H 组
4 w	3.40 ± 0.39	4.02 ± 0.39	3.86 ± 0.13	3.84 ± 0.28
12 w	4.53 ± 0.64	4.38 ± 0.14	4.24 ± 0.29	4.26 ± 0.10

2.2 胰岛 Ins 阳性细胞和 Glu 阳性细胞

光镜下 Ins、Glu 免疫反应阳性产物呈棕黄至棕褐色细颗粒状,位于胞质内。Ins 阳性细胞主要分布于胰岛中央,数量较多,与正常组比较,4 w、12 w 各剂量组 Ins 阳性细胞的分布、数量、免疫染色强度未见明显区别(见图 1)。Glu 阳性细胞主要分布于胰岛周边,与正常组比较,4 w 和 12 w 各剂量组 Glu 阳性细胞的分布、数量、免疫染色强度未见明显区别。见图 2。

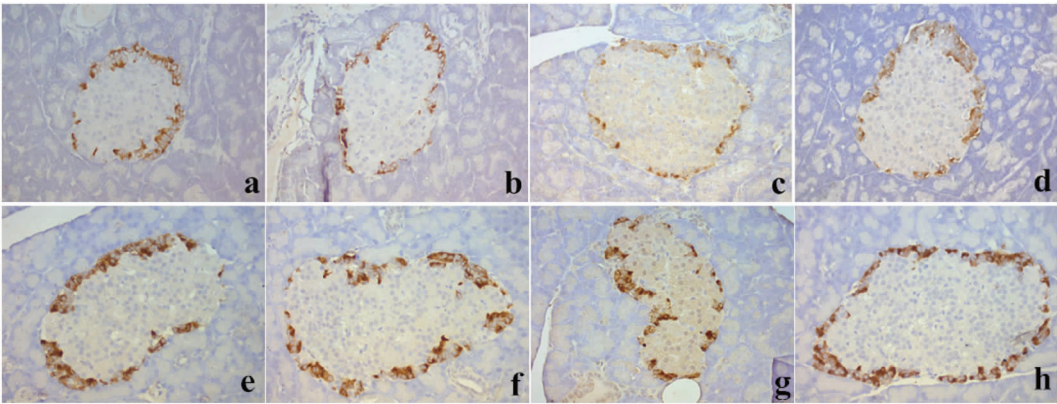
2.3 胰岛 Ins 阳性细胞和 Glu 阳性细胞光密度值

4 w、12 w 时,各实验组大鼠 Ins 阳性细胞平均光密度值(见表 2 和见表 4),Glu 阳性细胞的平均光密度值(见表 3 和见表 5),与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:a 为 4 w 时正常对照组,b、c 及 d 分别为 4 w 时的 L 组、M 组及 H 组;e 为 12 w 时正常对照组,f、g 及 h 分别为 12 w 时的 L 组、M 组及 H 组

图 1 对照组及某食用白酒各组大鼠胰岛 Ins 阳性细胞(SABC 法,×400)
Fig. 1 Ins positive cells of each group



注:a 为 4 w 时正常对照组,b、c 及 d 分别为 4 w 时的 L 组、M 组及 H 组;e 为 12 w 时正常对照组,f、g 及 h 分别为 12 w 时的 L 组、M 组和 H 组

图 2 对照组和某食用白酒各组大鼠胰岛 Glu 阳性细胞(SABC 法,×400)
Fig. 2 Glu positive cells of each group

表 2 各组大鼠胰岛 Ins 阳性细胞的
平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Values of the mean density of Ins
positive cell in each group

时间	平均光密度值			
	NCG 组	L 组	M 组	H 组
4 w	0.249 ± 0.006	0.227 ± 0.010	0.248 ± 0.011	0.222 ± 0.007
12 w	0.283 ± 0.018	0.318 ± 0.014	0.289 ± 0.024	0.309 ± 0.019

表 3 各组大鼠胰岛 Glu 阳性细胞的
平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Values of the mean density of Glu
positive cell in each group

时间	平均光密度值			
	NCG 组	L 组	M 组	H 组
4 w	0.240 ± 0.007	0.258 ± 0.008	0.262 ± 0.010	0.260 ± 0.009
12 w	0.336 ± 0.012	0.317 ± 0.014	0.311 ± 0.013	0.309 ± 0.013

表 4 各组大鼠胰岛 Ins 阳性细胞的
面数密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Values of the numerical density on area(N_A)
of Ins positive cell in each group

时间	面数密度值			
	NCG 组	L 组	M 组	H 组
4 w	15.688 ± 0.905	17.183 ± 1.142	15.183 ± 1.179	13.821 ± 0.542
12 w	16.008 ± 0.736	15.553 ± 0.762	14.434 ± 0.752	17.636 ± 1.161

表 5 各组大鼠胰岛 Glu 阳性细胞的
面数密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Values of the numerical density on area(N_A)
of Glu positive cell in each group

时间	面数密度值			
	NCG 组	L 组	M 组	H 组
4 w	6.435 ± 0.409	5.751 ± 0.566	5.412 ± 0.672	5.431 ± 0.638
12 w	5.170 ± 0.479	4.572 ± 0.278	6.384 ± 0.642	5.440 ± 0.444

3 讨论

随着酒文化的不断发展,如何科学饮酒已成为众人关注的热点,因此掌握饮酒的品质及剂量显得尤为重要。目前普遍认为饮酒不当会对消化系统(肝脏、胰腺、胃肠道等)、循环系统、脑血管及中枢神经系统、免疫、生殖系统、骨骼等造成影响^[13-14];但亦有研究认为,长期适当剂量的饮酒可以使糖尿病患者 Ins 敏感性增高,有利于血糖的调控^[15-17]。Baliunas 等^[18]通过随访研究发现,饮酒与糖尿病发病率呈 U 型曲线,适量饮酒有益血糖控制,能改善

胰岛素敏感性,降低糖尿病的发病率。Wannamethee 等^[19]对 109 690 例健康女性的研究结果提示,日均饮酒 5.0 ~ 14.9 g 的女性的糖尿病的危险系数最低,随着饮酒剂量的增加糖尿病的风险也增加,适量饮酒还可能通过减少血浆胎球蛋白 A 的浓度来降低 2 型糖尿病的发病率。胎球蛋白 A 是糖尿病风险的标志物,它可以抑制胰岛素的信号转导^[20]。Mary 等人^[21]的研究则表明,适量饮酒对血糖控制有益的机制可能包括生长因子受到抑制、胰岛素结合蛋白水平增加、糖异生减少、Ins 反调节激素下调、高密度脂蛋白一胆固醇(HDL, C)升高、C 反应蛋白(CRP)水平降低、循环中瘦素水平增加等有关。

有文献报道,机体葡萄糖的浓度状态决定了 Ins 与 Glu 之间的相互关系,因此, Glu 浓度主要与 Ins 和血糖相关^[22]。适量饮酒改善了 Ins 对碳水化合物反应的反应,使葡萄糖耐量降低,故减少了基础 Ins 分泌的同时降低了空腹 Glu 的浓度^[23]。同时酒精的代谢产物乙醛和乙酸也可刺激 Glu 分泌^[24]。而血糖的调控主要依赖于 Glu 与 Ins 相互拮抗,共同调控,使得血糖能够维持在一个动态平衡的稳定状态。但血糖水平还会受到机体内另外一些相关组织和器官的影响,如肠、肝、骨骼肌、脂肪组织。近来对血糖调控机制的研究发现肾脏以及大脑也参与了葡萄糖的调节^[25]。

本实验用某食用白酒 3 种剂量灌胃大鼠 4 w 及 12 w,观察各组大鼠胰岛 Ins 阳性细胞和 Glu 阳性细胞的表达、分布、免疫染色强度、平均光密度值,同时各时段与正常对照组大鼠胰岛比较,均未出现明显改变,提示胰岛 B 细胞分泌 Ins、A 细胞分泌 Glu 未受显著影响。而 Ins 阳性细胞及 Glu 阳性细胞的 N_A 也未见明显改变,说明灌胃后两种细胞的数量及胰岛面积均未发生明显变化,提示本实验设定的剂量和时长内予该品牌食用白酒灌胃大鼠,不会引起大鼠胰岛的这两种内分泌细胞功能改变,这可能是大鼠血糖未受到明显影响的机制之一。

4 参考文献

- [1] 张晓翠,王凤仙. 中国白酒未来发展趋势分析[J]. 中国白酒, 2012(11):38-40.
- [2] Xiao Z, Yu D, Niu Y, et al. Characterization of aroma compounds of Chinese famous liquors by gas chromatography-mass spectrometry and flash GC electronic-nose[J]. J

- Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014(3): 945–946; 92–100.
- [3] Wu Q, Zhu W, Wang W, et al. Effect of yeast species on the terpenoids profile of Chinese light-style liquor [J]. Food Chem, 2015(3): 390–395.
- [4] Zhang ZY, Fan WL, Xu Y. Comparative analysis of free amino acid content and composition in different aroma type Chinese liquors [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014(17): 280–284, 288.
- [5] Zhao L, Wang PP, Huang CC, et al. Application of Vis/NIR Spectroscopy for Chinese Liquor Discrimination [J]. Food Anal Methods, 2014(6): 133–134.
- [6] 胡红星, 刘铁桥. 酒精的生物学及生理效应 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2012(4): 253–259.
- [7] 曲巍, 孙秀发, 等. 过量酒精摄入引起的细胞因子变化对大鼠胰岛的影响 [J]. 中国公共卫生, 2004(10): 1174–1175.
- [8] Howard AA, Arnsten JH, Gourevitch MN. Effect of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review [J]. Ann Intern Med, 2004(3): 211–219.
- [9] Ting JW, Lauth WW. The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity [J]. Pharmacol Ther, 2006(2): 346–373.
- [10] 尹丹, 梁文妹. 白酒对大鼠血糖、胰岛 B 细胞表达 Ins 及血清 Ins 水平的影响 [J]. 酿酒科技, 2015(5): 56–59.
- [11] 成令忠. 现代组织学 [M]. 上海科学技术文献出版社, 2003: 829–843.
- [12] 张璞, 李容璐. 1 型糖尿病小鼠模型构建及胰岛 B 细胞中胰岛素的表达 [J]. 贵阳医学院学报, 2014(2): 171–179.
- [13] 李制英, 王晓丽. 适量饮酒有益心脏的机制 [J]. 心血管病学进展杂志, 2007(4): 647–650.
- [14] 赵娜, 孟羽俊. 酗酒与健康 [J]. 社区医学杂志, 200(10): 7–9.
- [15] Yokoyama H. Beneficial effects of ethanol consumption on insulin resistance are only applicable to subjects without obesity or insulin resistance; drinking is not necessarily a remedy for metabolic syndrome [J]. Int J Environ Res Public Health, 2011(7): 3019–31.
- [16] de Vegt F, Dekker JM, Groeneveld WJ, et al. Moderate alcohol consumption is associated with lower risk for incident diabetes and mortality: the Hoorn Study [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2002(1): 53–60.
- [17] 周振宇, 沈才洪. 低氘白酒对糖尿病大鼠糖代谢和胰岛细胞及其功能的影响 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010(10): 1204–1207.
- [18] Dolly O, Baliunas, Benjamin J, et al. Alcohol as a Risk Factor for Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis [J]. Diabetes Care, 2009(11): 2123–2132.
- [19] Wannamethee SG, Camargo CA Jr, Manson JE, et al. Alcohol drinking patterns and risk of type 2 diabetes mellitus among younger women [J]. Archives of Internal Medicine, 2003(11): 1329–1336.
- [20] Sylvia H, Ley, Qi S, et al. Association between alcohol consumption and plasma fetuin-A and its contribution to incident type 2 diabetes in women [J]. Diabetologia, 2014(1): 93–101.
- [21] Mary C, Dufour MD. What Is Moderate Drinking? Defining "Drinks" and Drinking Levels [J]. Alcohol Research & Health, 1999(1): 5–14.
- [22] Zarrin M, Wellnitz O, Bruckmaier RM. Conjoint regulation of glucagon concentrations via plasma insulin and glucose in dairy cows [J]. Domestic Animal Endocrinology, 2015(51): 74–77.
- [23] Bonnet F, Disse E, Laville M, et al. Moderate alcohol consumption is associated with improved insulin sensitivity, reduced basal insulin secretion rate and lower fasting glucagon concentration in healthy women [J]. Diabetologia, 2012(55): 3228–3237.
- [24] Niels KA, Thøgers T, Thorbjørn G, et al. Alcohol Increases Glucagon Secretion in Normal Man [J]. Alcoholism: clinical and experimental research, 2004(11): 1643–1647.
- [25] Triplitt, Curtis L. Examining the Mechanisms of Glucose Regulation [J]. American Journal of Managed Care, 2012(1 suppl): s4–s10.

(2015-09-11 收稿, 2015-10-12 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 刘 华