

香烟烟雾暴露对小鼠糖代谢的影响 及穿心莲内酯的干预效果

鹿奎奎¹, 汪嘉琦², 丁甘玲², 陈冲², 向全永³, 卞倩¹

1. 江苏省疾病预防控制中心毒理与风险评估研究所, 江苏 南京 210009;

2. 东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009

3. 江苏省疾病预防控制中心慢性非传染病防制所, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 探讨香烟烟雾暴露对小鼠糖代谢的影响及穿心莲内酯的干预效果,为糖尿病预防及烟草控制提供依据。**方法** 选择 SPF 级 C57BL/6J 品系雄性小鼠 60 只,按照小鼠体重随机分为正常对照组(A组)、烟雾暴露组(B组)和烟雾暴露+穿心莲内酯干预组(C组),每组 20 只。B组和C组小鼠每天暴露于 20 支香烟的烟雾 60 min,持续 3 个月;C组小鼠每周腹腔内注射穿心莲内酯(10 mg/kg),A组和B组注射同等体积生理盐水。香烟烟雾暴露结束后施行腹腔内注射葡萄糖耐量实验(IPGTT)和胰岛素耐量实验(IPITT),比较各组小鼠各时点血糖变化及 IPGTT 和 IPITT 血糖水平的曲线下面积。**结果** 0 min 时,B组的血糖最高,C组次之。IPGTT 示,腹腔注射葡萄糖后各组小鼠的血糖水平迅速增加,注射后 15 min 最高,随后逐渐下降,且 B 组在 15 min 和 30 min 时的血糖水平均显著高于 A 组($P<0.01$);B组和C组血糖水平的曲线下面积均显著大于 A 组($P<0.05$),B组显著大于 C 组($P<0.05$)。IPITT 示,腹腔注射胰岛素后,15 min 时 B 组血糖水平显著高于 A 组($P<0.05$),30 min 和 60 min 时各组小鼠的血糖水平及血糖曲线下面积差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 香烟烟雾可能主要通过影响胰岛素分泌功能,引起小鼠糖代谢的异常,而穿心莲内酯可以拮抗这种损伤。但未发现香烟烟雾对小鼠的胰岛素敏感性有明显影响。

关键词: 香烟烟雾暴露; 动物实验; 糖代谢; 胰岛素功能; 穿心莲内酯

中图分类号: R181.3⁺8 R-33 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2022)01-0006-05

Influences of cigarette smoke exposure on glucose metabolism in mice and intervention effect of andrographolide

LU Kui-kui^{*}, WANG Jia-qi, DING Gan-ling, CHEN Chong, XIANG Quan-yong, BIAN Qian

^{*}Institute of Toxicology and Risk Assessment, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Corresponding author: BIAN Qian, E-mail: bianqian@jscdc.cn; XIANG Quan-yong, E-mail: quanyongxiang@vip.sina.com

Abstract: Objective To investigate the impacts of cigarette smoke (CS) exposure on glucose metabolism in mice and the intervention effect of andrographolide to provide evidence for diabetes prevention and tobacco control. **Methods** Sixty SPF male mice of C57BL/6J strain were selected and randomly divided into normal control group (group A), CS exposure group (group B) and CS exposure plus andrographolide intervention group (group C) according to their body weight ($n=20$, each). The mice in group B and C were exposed to 20 cigarettes smoke for 60 minutes every day for 3 months. Mice in group C were injected with andrographolide (10 mg/kg) intraperitoneally every week, and mice in group A and group B were injected with the same volume of normal saline. After CS exposure, intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) and intraperitoneal insulin tolerance tests (IPITT) were performed to compare the changes in blood glucose and the area under the curve (AUC) of blood glucose levels of IPGTT and IPITT among three groups at each time point. **Results** The blood glucose level was the highest in group B, followed by group C at 0 min. After

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.01.001

基金项目: 国家自然科学基金(81973005, 81772379)

通信作者: 卞倩, E-mail: bianqian@jscdc.cn; 向全永, E-mail: quanyongxiang@vip.sina.com

intraperitoneal injection of glucose, the blood glucose levels in three groups increased rapidly and were the highest at 15 minutes after injection, and then they gradually decreased. The blood glucose levels in group B were significantly higher than those in group A at 15 min and 30 min ($P<0.01$). The AUC of blood glucose levels in group B and group C was significantly larger than that in group A ($P<0.05$), and the AUC in group B was significantly larger than that in group C ($P<0.05$). After intraperitoneal injection of insulin, the blood glucose level in group B was significantly higher than that in group A at 15 min, and there were no significant differences in the blood glucose levels at 30 min and 60 min among three groups. Also, there was no significant difference in AUC of IPITT among three groups ($P>0.05$). **Conclusion** Cigarette smoke may cause abnormal glucose metabolism in mice by affecting insulin secretion, and andrographolide can antagonize this damage, but it is not found that cigarette smoke exposure has a significant effect on insulin sensitivity in mice.

Keywords: Cigarette smoke exposure; Animal experiments; Glucose metabolism; Insulin function; Andrographolide

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81973005, 81772379)

糖尿病是以胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足为病理基础、以持续高血糖为特征的代谢紊乱性疾病;目前全球有约4.22亿糖尿病人,如果不加干预这一数字到2045年可能增加到6.28亿^[1-2]。我国成年糖尿病患者1.13亿^[3],居世界首位。2018年中国成人烟草调查结果显示,我国15岁及以上人群吸烟率为26.6%,其中,男性为50.5%,女性为2.1%;中国的吸烟人数占世界吸烟人数的1/3,是最大的烟草消费国、生产国和受害国^[4-5]。可见糖尿病和烟草使用均为我国重要的公共卫生问题。近年来,吸烟与糖代谢异常及糖尿病关系的研究一直是被关注的热点问题^[6],不仅有直观的人群横断面调查和队列研究,吸烟与糖尿病关系的机制的探讨也逐渐深入^[7];大量的研究结果提示,吸烟和烟草烟雾可以增加糖尿病的罹患风险,同时吸烟对糖尿病患者的血管损伤也显著增加^[8-10],但确切的致病机制尚不清楚。

穿心莲内酯是植物中重要的天然化学成分之一,具有显著的抗氧化和抗炎功效,且无明显毒副作用,已被广泛用于保健品中^[11-12]。有研究发现穿心莲内酯是一种不可逆的核因子(NF)- κ B拮抗剂,其通过阻断NF- κ B激活而拮抗炎症所致的多种疾病^[13],而且已发现穿心莲内酯可通过抗炎和抗氧化而拮抗吸烟所致的肺损害^[14]。而穿心莲内酯能否拮抗吸烟引起的糖代谢异常报道很少。本研究拟通过慢性动物实验,探讨香烟烟雾暴露对小鼠葡萄糖耐量和胰岛素敏感性的影响及穿心莲内酯的干预效果,为糖尿病预防和烟草控制提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及饲养方法 实验动物使用雄性C57BL/6J品系小鼠(SPF级),购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK

(京)2016~0011号;8周龄,体重18~22g,共60只。小鼠进行适应性饲养1周后,按照小鼠体重用随机数字表法分组,共3组,每组20只。清洁级鼠饲料和刨花垫料均购自江苏省协同医药生物工程,苏饲证(2019)01008。小鼠每笼10只,饲养在江苏省疾病预防控制中心实验动物屏障设施内,设施使用许可证号:SYXK(苏)2017~0031。饲养环境温度为20~24℃,湿度为40%~70%,光照条件为12h/12h明暗交替。实验期间,所有动物自由摄食和饮用无菌水。本研究通过江苏省疾病预防控制中心实验动物福利伦理委员会审查(编号:DL2017011)。

1.2 动物分组及染毒方法 三组小鼠分为正常对照组(A组);烟雾暴露组(B组);烟雾暴露+穿心莲内酯干预组(C)。A组小鼠喂食清洁级饲料,B组和C组小鼠每天在静式染毒柜中暴露于20支香烟的烟雾,于每日9:00~10:00之间暴露60min,持续3个月。将穿心莲内酯溶解在二甲基亚砜中并用生理盐水稀释,每周以10mg/kg的剂量对C组小鼠进行腹腔内注射,A组和B组注射同等体积的生理盐水。

1.3 观察指标 末次香烟烟雾暴露后禁食12h,使用小型电子天平称取小鼠体重,并进行腹腔内注射葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT),按照小鼠体重(1g/kg)腹腔注射葡萄糖,于0、15、30、60和120min,用快速血糖仪(罗氏血糖仪)检测小鼠尾静脉血糖。小鼠休息缓解48h后禁食6h,进行腹腔内注射胰岛素耐受实验(intraperitoneal insulin tolerance test, IPITT),按照小鼠体重(0.4~0.5 μ /kg)腹腔注射胰岛素,于0、15、30和60min,用快速血糖仪检测小鼠尾静脉血糖。

1.4 统计学方法 所有数据及时录入Epidata 3.5软件,经逻辑校验无误后形成最终数据库。使用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。体重数据以 $\bar{x}\pm s$ 表

示,采用配对 *t* 检验;重复测量的血糖数据,采用两因素重复测量方差分析进行分析,方差分析有统计学意义的采用 Dunnett 法进行两两之间的比较; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。根据血糖值绘制葡萄糖动态曲线,IPGTT 的曲线下面积 (AUC) 计算方法为: $AUC(\text{min} \cdot \text{mmol/L}) = 60 \times (1/8 \times 0 \text{ min 时糖} + 1/4 \times 15 \text{ min 时糖} + 3/8 \times 30 \text{ min 时糖} + 3/4 \times 60 \text{ min 时糖} + 1/2 \times 120 \text{ min 时糖})$; IPITT 的 AUC 计算方法为: $AUC(\text{min} \cdot \text{mmol/L}) = 60 \times (1/8 \times 0 \text{ min 时糖} + 1/4 \times 15 \text{ min 时糖} + 3/8 \times 30 \text{ min 时糖} + 1/4 \times 60 \text{ min 时糖})$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠实验前和实验结束时体重的变化 实验结束时,各组小鼠的体重均有增加,且与实验开始时的体重差异有统计学意义($P<0.01$)。实验结束时 B 组小鼠体重最大,与 C 组小鼠体重比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 IPGTT 结果比较 注射葡萄糖前,0 min 时香烟烟雾暴露组(B组)的血糖最高,其次是烟雾暴露+穿

心莲内酯组(C组),三组之间血糖水平差异有显著统计学意义($P<0.01$)。注射葡萄糖后,各组小鼠的血糖水平迅速上升,注射后 15 min 水平最高,随后逐渐下降,120 min 的血糖水平基本恢复到注射前水平,且 B 组在 15 min 和 30 min 时的血糖水平均显著高于 A 组($P<0.01$)。A、B 和 C 组的 15 min 与 30 min 血糖水平比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 2、图 1A。B 组和 C 组的 AUC 均显著大于 A 组($P<0.05$),B 组的 AUC 显著大于 C 组($P<0.05$),见图 1B。

表 1 实验前后小鼠体重的标化 ($n=20, g, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Standardization of mouse body weight before and after experiment ($n=20, g, \bar{x} \pm s$)

组别	实验开始时	实验结束时	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	25.58±1.86	28.84±1.96 ^a	3.992	0.001
B 组	24.85±1.28	30.51±1.96 ^b	8.502	<0.001
C 组	25.78±1.62	28.53±1.58	3.438	0.004
<i>F</i> 值	1.862	6.685		
<i>P</i> 值	0.165	0.025		

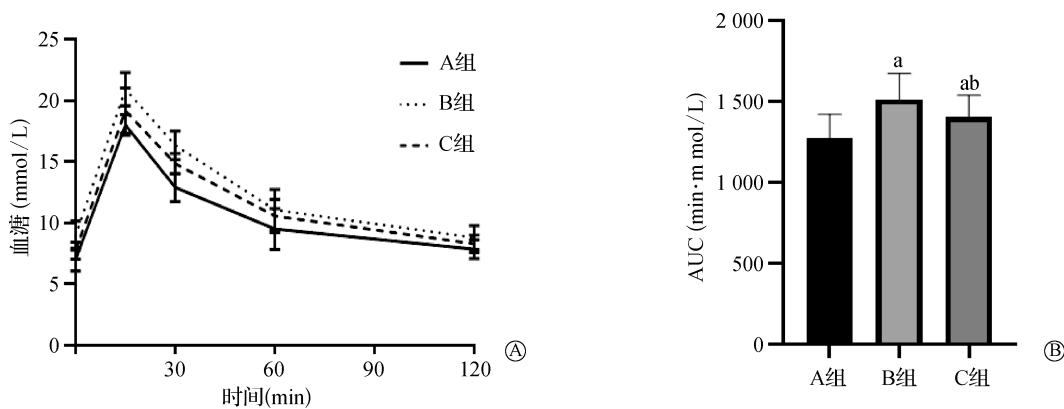
注:与 B 组相比,^a $P<0.05$;与 C 组相比,^b $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠 IPGTT 中血糖值比较 ($n=20, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of blood glucose levels during IPGTT of mice in each group ($n=20, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖值				
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
A 组	7.00±0.95	18.00±0.87	12.90±1.15 ^c	9.50±1.67 ^c	7.87±0.78 ^c
B 组	8.97±1.18 ^{ac}	20.93±1.36 ^a	16.35±1.17 ^{ac}	11.08±1.67 ^{ac}	8.80±0.98 ^{ac}
C 组	7.73±0.69 ^{bc}	19.18±1.85 ^{ab}	14.85±0.83 ^{abc}	10.58±1.36 ^{ac}	8.30±0.71 ^c
<i>F</i> 组间/ <i>P</i> 组间	81.611/ <0.001				
<i>F</i> 时间/ <i>P</i> 时间	980.103/ <0.001				
<i>F</i> 交互/ <i>P</i> 交互	3.906/ <0.001				

注:与 A 组相比,^a $P<0.01$;与 B 组比较,^b $P<0.01$;与 15 min 血糖值相比,^c $P<0.01$ 。



注:A 为各组小鼠 IPGTT 中血糖曲线图;B 为各组小鼠 IPGTT 中血糖的 AUC 比较;与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$ 。

图 1 各组小鼠 IPGTT 结果比较

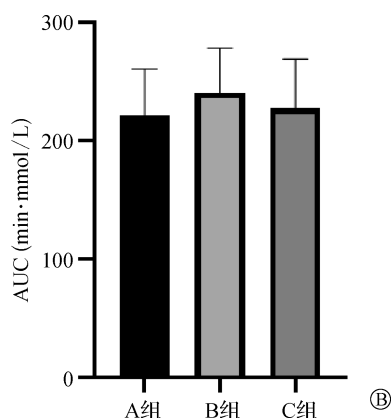
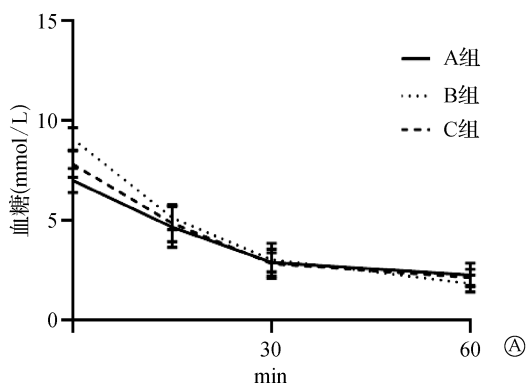
Fig. 1 Comparison of IPGTT results of mice in each group

2.3 IPITT 结果比较 IPGTT 结束时,小鼠休息缓解 48 h(自由摄食和饮用无菌水)后禁食 6 h,按照体重给各组小鼠腹腔注射胰岛素(0.4~0.5 μ/kg),分别测定 0、15、30 和 60 min 时小鼠血糖水平。空腹 0 min 时血糖水平与 IPGTT 时基本一致。15 min 时 B 组血糖水平显著高于 A 组 ($P<0.05$),30 min 和 60 min 时各组小鼠的血糖水平差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 3)。各组小鼠 IPITT 中血糖值的 AUC 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 2)。随着测定时间的延长,各组小鼠的血糖水平显著下降;A、B 和 C 组的 15 min 血糖值均明显低于 0 min 的血糖值 ($P<0.01$) (表 3)。

表 3 各组小鼠 IPITT 中血糖值比较 ($n=20, \text{mmol/L}, \bar{x}\pm s$)
Tab. 3 Comparison of blood glucose levels during IPITT of mice in each group ($n=20, \text{mmol/L}, \bar{x}\pm s$)

分组	血糖值			
	0 min	15 min	30 min	60 min
A 组	6.99±0.60	4.66±1.02 ^c	2.89±0.48 ^c	2.25±0.60 ^c
B 组	9.08±0.56 ^a	5.13±0.60 ^{ac}	3.03±0.81 ^c	1.83±0.42 ^c
C 组	7.80±0.67 ^{ab}	4.86±0.93 ^c	2.83±0.74 ^c	2.13±0.42 ^c
$F_{\text{组间}}/P_{\text{组间}}$	14.440/ <0.001			
$F_{\text{时间}}/P_{\text{时间}}$	888.902/ <0.001			
$F_{\text{交互}}/P_{\text{交互}}$	12.870/ <0.001			

注:与 A 组比,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 0 min 血糖值相比,^c $P<0.05$ 。



注:A 为各组小鼠 IPITT 中血糖曲线图;B 为各组小鼠中 IPITT 血糖的 AUC 比较。

图 2 各组小鼠 IPITT 结果比较

Fig. 2 Comparison of IPITT results of mice in each group

3 讨论

国内外人群流行病学调查结果显示,吸烟可以显著增加罹患糖尿病的风险^[5,15],产前吸烟与妊娠期糖尿病的高发病率相关^[16]。美国一项针对 4 万余名 40~75 岁男性、无糖尿病者长达 6 年的随访调查结果显示,在调整了混杂因素后,吸烟量每日 15~24 支的被调查者患 2 型糖尿病的风险是从不吸烟者的 2.38 倍^[17]。中国一项对 5 万余名 30~79 岁的成人调查结果显示,吸烟者患糖尿病风险调整后的 HR 为 1.18,且随着吸烟量的增加患糖尿病的风险逐渐增加,有显著的剂量-效应关系^[18]。一项超过 1 000 万名 20~49 岁中国妇女的横断面研究结果显示,丈夫吸烟与妻子罹患空腹血糖受损和糖尿病的风险之间存在显著关系^[19]。虽然吸烟与糖尿病的关系研究结果较多,但其确切的机制尚无明确的定论。

本课题组前期的人群调查结果显示,与不吸烟人

群相比,现在吸烟人群调整后的胰岛素分泌指数 (HOMA-β) 为 54.86%,显著低于不吸烟人群 (58.18%) ($P=0.0257$),而胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 差异无统计学意义^[17]。本次动物实验结果表明,经过 3 个月的香烟烟雾暴露,小鼠明显出现了高血糖现象;糖耐量实验也证实烟雾暴露组小鼠血糖的代谢状况出现明显异常;且穿心莲内酯对这种损伤有较明显的拮抗作用,可推测小鼠胰岛素的分泌功能受到了影响。有实验证明,尼古丁可与胰岛细胞上烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 结合,影响胰岛细胞的增殖和胰岛素分泌;同时尼古丁暴露后,大鼠的 Fas 及 FasL 蛋白表达明显增加, Bcl2/Bax 比率增加,从而引起胰岛 β 细胞凋亡^[7]。本研究小鼠的胰岛素敏感性实验结果显示,注射胰岛素后,小鼠的血糖含量迅速下降,且 30 min 后各组小鼠的血糖水平及血糖曲线下面积差异均无统计学意义,推测香烟烟雾暴露对小鼠的胰岛素敏感性无明显影响,这与本课题组前期人群调查的结果一致^[20]。

目前吸烟与糖尿病之间确切关系的研究报道结果差异较大,且机制尚不明确,但吸烟可以增加糖尿病的罹患风险已经得到学界的公认。本研究证实烟雾暴露可以引起小鼠血糖代谢的紊乱,特别是对胰岛功能的影响,而穿心莲内酯可以拮抗这种损伤。

参考文献

- [1] Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 311-321.
- [2] World Health Organization. Diabetes[EB/OL]. (2021-05-11) https://www.who.int/health-topics/diabetesatab=tab_1.
- [3] Xu Y, Wang LM, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [4] 中国疾病预防控制中心控烟办. 2018年中国成人烟草调查结果发布——我国15岁及以上人群吸烟率呈下降趋势[EB/OL]. (2019-05-30). http://www.chinacdc.cn/jkzt/sthd_3844/slhd_4156/201905/t20190530_202932.
- [5] 丁露,肖新华. 吸烟与糖尿病[J]. *中华糖尿病杂志*, 2020, 12(9): 736-739.
Ding L, Xiao XH. Smoking and diabetes[J]. *Chin J Diabetes*, 2020, 12(9): 736-739.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress. USA [R]: Department of Health and Human Services, 2014.
- [7] 汪秋实,韩翱瀚,曹焯,等. 吸烟与糖代谢异常关系研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(7): 1132-1135.
Wang QS, Han AH, Cao Y, et al. Advances in researches on relationship between cigarette smoking and abnormal glucose metabolism[J]. *Chin J Public Heal*, 2017, 33(7): 1132-1135.
- [8] Pan A, Wang YL, Talaei M, et al. Relation of active, passive, and quitting smoking with incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(12): 958-967.
- [9] Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, et al. Risk factors, mortality, and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(7): 633-644.
- [10] Maddatu J, Anderson-Baucum E, Evans-Molina C. Smoking and the risk of type 2 diabetes[J]. *Transl Res*, 2017, 184: 101-107.
- [11] Kim SJ, Kwon DY, Kim YS, et al. Peroxyl radical scavenging capacity of extracts and isolated components from selected medicinal plants[J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(6): 867-873.
- [12] 杨雪松,高慧媛,张又夕,等. 穿心莲内酯药理作用的研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(4): 518-522.
Yang XS, Gao HY, Zhang YX, et al. Research progress in pharmacological action of andrographolide[J]. *J Trop Med*, 2019, 19(4): 518-522.
- [13] Li J, Luo L, Wang XY, et al. Inhibition of NF-kappaB expression and allergen-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model by andrographolide[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(5): 381-385.
- [14] Guan SP, Tee W, Ng DSW, et al. Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(7): 1707-1718.
- [15] Gholipour K, Asghari-Jafarabadi M, Iezadi S, et al. Modelling the prevalence of diabetes mellitus risk factors based on artificial neural network and multiple regression[J]. *East Mediterr Health J*, 2018, 24(8): 770-777.
- [16] Yael BZ, Haile ZT, Azulay CI. Association between prenatal smoking and gestational diabetes mellitus[J]. *Obstetrics and Gynecology*, 2020, 135(1): 91-99.
- [17] Rimm EB, Chan J, Stampfer MJ, et al. Prospective study of cigarette smoking, alcohol use, and the risk of diabetes in men[J]. *BMJ*, 1995, 310(6979): 555-559.
- [18] Liu X, Bragg F, Yang L, et al. Smoking and smoking cessation in relation to risk of diabetes in Chinese men and women: a 9-year prospective study of 0.5 million people[J]. *Lancet Public Health*, 2018, 3(4): e167-e176.
- [19] Minjin Z, Ying Y, Fangchao L, et al. The association of husbands' smoking with wives' dysglycemia status: A cross-sectional study among over 10 million Chinese women aged 20-49[J]. *Journal of diabetes*, 2020, 12(5): 354-364.
- [20] Wang C, Wang YJ, Wu JX, et al. Current smoking dose-dependently associated with decreased β -cell function in Chinese men without diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 841768.

收稿日期:2021-06-11 修回日期:2021-08-26 编辑:叶小舟