

GPR40 激动剂 SZZ15-11 对自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠糖脂代谢紊乱的调控作用

雷 蕾^{1#}, 翟佳羽^{1#}, 周 甜^{1,2}, 刘 泉¹, 刘率男¹, 李彩娜^{1*}, 曹 慧¹,
冯存玉¹, 吴 敏¹, 陈蕾蕾¹, 雷丽冉¹, 潘 璇¹, 刘站柱¹, 环 奕^{1*}, 申竹芳¹

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然活性物质与功能国家重点实验室, 晶型药物研究北京市重点实验室, 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050; 2. 郑州大学附属儿童医院药学部, 河南 郑州 450018)

摘要: G 蛋白偶联受体 40 (G protein-coupled receptor 40, GPR40) 是 G 蛋白偶联受体家族成员, 对糖脂代谢有重要调控作用。本研究旨在考察新型 GPR40 激动剂 SZZ15-11 对自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠糖脂代谢的影响, 并探讨其潜在机制。将 KKA^y 小鼠随机分为 4 组, 一组以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethylcellulose, CMC) 灌胃为模型组 (vehicle)、一组以 TAK875 (50 mg·kg⁻¹) 灌胃为阳性对照组 (TAK), 另两组分别以不同剂量 SZZ15-11 (50 和 100 mg·kg⁻¹) 灌胃为给药组 (SZZ 50 mg·kg⁻¹ 和 SZZ 100 mg·kg⁻¹), 每天一次, 共 45 天。于给药期间, 检测空腹血糖、随机血糖、血甘油三酯 (triglyceride, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平, 进行口服葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验, 同时通过酶联免疫吸附方法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定小鼠血胰岛素和胰高血糖素水平。实验结束后处死小鼠, 取肝组织, 测定 TG 和 TC 含量, 用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肝组织病理形态, 通过 Western blot 和 RT-PCR 探讨肝组织脂代谢相关信号通路改变。实验经中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会的审查批准。在人肝肿瘤细胞 HepG2 和 TNF α 诱导 3T3-L1 胰岛素抵抗脂肪细胞模型, 通过 Western blot 探讨 SZZ15-11 对胰岛素信号通路和脂联素表达的影响。结果显示, SZZ15-11 不仅可降低 KKA^y 小鼠的高血糖、高血脂, 增强胰岛素敏感性, 还可增加小鼠空腹血糖高血糖素水平, 促进糖负荷后胰岛素分泌; 能改善小鼠肝组织脂肪变性, 保护肝功能; 在肝组织中, 可上调 AMPK α 磷酸化, 使胆固醇代谢相关基因 *Abcg8* 表达增加; 在肝细胞和胰岛素抵抗脂肪细胞模型, 可增强胰岛素信号, 明显减弱 TNF α 对脂联素表达的抑制作用。提示 GPR40 激动剂 SZZ15-11 能有效调控糖脂代谢紊乱, 是一新型的、有潜力的抗糖尿病候选化合物。

关键词: G 蛋白偶联受体 40; 2 型糖尿病; 糖脂代谢; 肝脂肪变性; 胰岛素抵抗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2782-09

GPR40 novel agonist SZZ15-11 regulates glucolipid metabolic disorders in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice

LEI Lei^{1#}, ZHAI Jia-yu^{1#}, ZHOU Tian^{1,2}, LIU Quan¹, LIU Shuai-nan¹, LI Cai-na^{1*}, CAO Hui¹, FENG Cun-yu¹,
WU Min¹, CHEN Lei-lei¹, LEI Li-ran¹, PAN Xuan¹, LIU Zhan-zhu¹, HUAN Yi^{1*}, SHEN Zhu-fang¹

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Department of Pharmacy, the Affiliated Children's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450018, China)

Abstract: G protein-coupled receptor (GPR) 40, as one of GPRs family, plays a potential role in regulating

收稿日期: 2024-04-28; 修回日期: 2024-07-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803597, 82200883, 82373922); 中国医学科学院创新工程项目 (2022-I2M-2-002, 2021-I2M-1-026); 河南省医
学科技攻关计划项目 (222102310496).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165194, E-mail: huany@imm.ac.cn; leccaina@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0410

glucose and lipid metabolism. To study the effect of GPR40 novel agonist SZZ15-11 on hyperglycemia and hyperlipidemia and its potential mechanism, spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and murine mature adipocyte 3T3-L1 cells were used. KKA^y mice were divided into four groups, vehicle group, TAK group, SZZ (50 mg·kg⁻¹) group and SZZ (100 mg·kg⁻¹) group, with oral gavage of 0.5% sodium carboxymethylcellulose (CMC), 50 mg·kg⁻¹ TAK875, 50 and 100 mg·kg⁻¹ SZZ15-11 respectively for 45 days. Fasting blood glucose, blood triglyceride (TG) and total cholesterol (TC), non-fasting blood glucose were tested. Oral glucose tolerance test and insulin tolerance test were executed. Blood insulin and glucagon were measured *via* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). After mice's execution, liver tissue was harvested to test TG and TC content. Then pathological morphology of liver was observed through hematoxylin-eosin (HE) staining, and the lipid metabolism relative signal pathway was analyzed by Western blot and RT-PCR. The experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College. At the same time, Akt phosphorylation level in HepG2 cells and adiponectin in 3T3-L1 cells treated with TNF α were measured with Western blot. The results show that SZZ15-11 not only decreased blood glucose and lipid, improved insulin sensitivity, but also increased fasting blood glucagon and promoted insulin secretion after glucose loading in KKA^y mice. Additionally, SZZ15-11 alleviated hepatic steatosis and liver dysfunction in KKA^y mice. In liver tissue, SZZ15-11 increased AMPK α phosphorylation level and cholesterol metabolism relative gene *Abcg8* transcription. In HepG2 cells, SZZ15-11 increased Akt phosphorylation level. In adipocyte 3T3-L1, SZZ15-11 recovered the decreased adiponectin expression by TNF α . This study proved that GPR40 agonist SZZ15-11 could be a candidate compound for regulating glucolipid metabolic disorder.

Key words: G protein-coupled receptor 40; type 2 diabetes; glucose and lipid metabolism; hepatic steatosis; insulin resistance

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPR) 40 作为膜受体 GPRs 的成员, 主要表达于中枢神经系统、胰岛 β 细胞、肠道内分泌 I 细胞、K 细胞和 L 细胞, 以及免疫细胞^[1]。此外, 胰岛 α 细胞和肝细胞也有 GPR40 表达^[2,3]。其可被中链脂肪酸和长链脂肪酸激活^[4]。研究表明, 活化 GPR40, 在胰岛 β 细胞可促进葡萄糖刺激胰岛素分泌^[5], 在肠道内分泌 L 和 K 细胞可促进胰高血糖素样肽 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 和肠抑胃肽 (gastric inhibitory polypeptide, GIP) 分泌^[6]。因此, GPR40 可作为潜在药物靶点用于抗糖尿病新药开发^[7]。

化合物 SZZ15-11 是本实验室发现的新型 GPR40 激动剂^[8]。前期研究发现, SZZ15-11 可促进正常 ICR 小鼠葡萄糖刺激胰岛素分泌和 GLP-1 分泌, 降低糖负荷后血糖^[8], 可改善高脂饮食诱导肥胖 C57BL/6J (diet-induced obesity, DIO) 小鼠的糖脂代谢和脂肪肝^[9]。但 SZZ15-11 对 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的作用尚未系统报道, 其对外周组织胰岛素敏感性的调控作用也需进一步确认。

KKA^y 小鼠作为一种自发性 2 型糖尿病动物模型, 主要特征包括肥胖、高血糖、高血脂、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、肝脂肪变性等, 与 2 型糖尿病患者特点相似^[10]。因此, 本研究将通过自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小

鼠评价 SZZ15-11 对糖脂代谢紊乱的调控作用, 为其作为候选化合物用于 2 型糖尿病的治疗提供实验依据。

材料与方法

主要试剂及材料 化合物 SZZ15-11 由中国医学科学院药物研究所刘站柱教授课题组提供。DMEM 培养基和 TriZol (货号: 6123152、99088701) 均购自美国 Invitrogen 公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: aq32352999) 购自北京翱擎生物科技有限公司。高脂饲料 (D12451) 购自美国 Research Diet 公司。葡萄糖、甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 检测试剂盒 (货号: 100020100、100060102、100060092) 均购自中国中生北控生物技术有限公司。丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (货号: C009-2-1、C010-2-1) 均购自南京建成生物技术有限公司。小鼠胰岛素酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (货号: 09828) 购自美国 ALPCO 公司。胰高血糖素 ELISA 检测试剂盒 (货号: P356414) 购自美国 R&D 公司。RT-PCR 所用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒和 TransStart Green qPCR

SuperMix 试剂盒 (货号: AT311、AQ141-04) 均购自中国北京全式金生物技术有限公司。组织蛋白样品制备所用 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 (货号: C1053、P1265、P1260)、山羊抗兔 IgG/HRP (货号: C1309) 均购自中国北京普利莱基因技术有限公司。HMGR 抗体 (货号: ab174830) 购自美国 Abcam 公司。HSP90 抗体、AMPK α 抗体、磷酸化 AMPK α (pAMPK α) 抗体、Akt 抗体、磷酸化 Akt (pAkt) 抗体和脂联素 (adiponectin) 抗体 (货号: 4877、2532、2535、2920、13038、2789) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

实验动物 自发性 2 型糖尿病 KKA γ 小鼠 (37~42 g, 雌性) 购自北京华阜康生物科技有限公司, 饲养于中国医学科学院药物研究所 SPF 级动物房 (22 \pm 1) $^{\circ}$ C, 并给予高脂饲料喂养, 自由摄取食水。动物实验操作过程均依照中国医学科学院《药物研究所动物实验中心标准操作规程》及实验动物管理与使用委员会的要求执行, 并获得审查批准。

动物分组与给药方法 小鼠连续高脂喂养 4 周后禁食 4 h, 灌胃给予葡萄糖 2.0 g \cdot kg $^{-1}$, 分别检测空腹血糖、血脂、体重和糖负荷后 30 min 血糖等。并依据空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血 TG 和 TC、体重 (body weight, BW) 及 30 min 血糖上升百分数将小鼠随机分为模型组 (vehicle)、SZZ15-11 低剂量 (SZZ 50 mg \cdot kg $^{-1}$) 和高剂量 (SZZ 100 mg \cdot kg $^{-1}$) 组、阳性对照组 (TAK) 共 4 组 (表 1), 每组 10 只, 分别灌胃给予 0.5% 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethylcellulose, CMC)、SZZ15-11 50 和 100 mg \cdot kg $^{-1}$ 、TAK875 50 mg \cdot kg $^{-1}$, qd, 连续 45 天。定期监测摄食量、饮水量和体重, 按实验计划 (图 1A) 依次测定相关指标。

血糖和血脂测定 采集小鼠的随机血样, 用葡萄糖氧化酶法检测随机血糖 (non-fasting blood glucose, NFBG)。小鼠禁食 4 h 后, 尾尖取血, 用相应方法、试剂盒分别检测 FBG、血 TG 和 TC 水平。

口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 小鼠禁食 4 h, 灌胃给予葡萄糖 2.0 g \cdot kg $^{-1}$, 分别在糖负荷前 (0 min)、糖负荷后 15、30、60 和 120 min 尾尖取血, 测定血糖, 并计算血糖曲线下面积 (area

under curve, AUC)。

胰岛素耐量试验 (insulin tolerance test, ITT) 小鼠禁食 4 h, 皮下注射 0.4 U \cdot kg $^{-1}$ 胰岛素, 分别在胰岛素注射前 (0 min)、注射后 40 和 90 min 尾尖取血, 测定血糖, 并计算 AUC。

口服葡萄糖刺激胰岛素分泌试验 (oral glucose-stimulated insulin secretion test, OGSIST) 小鼠禁食 4 h, 灌胃给予葡萄糖 2.0 g \cdot kg $^{-1}$, 分别在给糖前 (0 min) 和给糖后 5 min 尾尖取血, 用相应试剂盒检测胰岛素含量。

胰高血糖素检测 小鼠禁食 4 h, 眼眶取血, 用相应试剂盒检测胰高血糖素水平。

肝功能和肝组织脂质含量测定、肝形态学观察 于实验结束后, 处死小鼠, 收集血样和肝组织。用相应试剂盒测定血 ALT 和 AST 水平。制备 10% 肝组织匀浆, 取上清检测肝组织中 TG 和 TC 含量。

小部分肝组织用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋, 制备 5 μ m 厚组织切片, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。显微镜下观察分析肝细胞形态变化。

RT-PCR 实验 用 TriZol 制备肝组织匀浆并抽提组织细胞中的 RNA。取 1 μ g 用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒逆转录合成 cDNA。随后通过 TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒检测肝组织细胞中各基因的 mRNA 水平。RT-PCR 的引物序列见表 2。

细胞培养 人肝肿瘤细胞 HepG2 接种在 24 孔板中, 用 DMEM 高糖培养基 (含 10% FBS、100 u \cdot mL $^{-1}$ 青霉素和 100 u \cdot mL $^{-1}$ 链霉素) 培养至 80% 融合后, 在含有赋形剂 (vehicle) 或 1、10 μ mol \cdot L $^{-1}$ SZZ15-11 的 DMEM 低糖培养基饥饿 1 h。随后, 更换为含 vehicle 或 1、10 μ mol \cdot L $^{-1}$ SZZ15-11 的 DMEM 高糖培养基, 同时加入 10 nmol \cdot L $^{-1}$ 胰岛素处理 30 min。

小鼠胚胎成纤维细胞 3T3-L1 在扩展培养基 (含 10% FBS、100 u \cdot mL $^{-1}$ 青霉素和 100 u \cdot mL $^{-1}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基) 生长至 100% 融合后, 再在诱导培养基 (含 10% FBS、100 u \cdot mL $^{-1}$ 青霉素、100 u \cdot mL $^{-1}$ 链霉素、0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、1 μ mol \cdot L $^{-1}$ 地塞米松和 10 μ g \cdot mL $^{-1}$ 胰岛素的 DMEM 高糖培养基) 中

Table 1 Parameters of spontaneous type 2 diabetic KKA γ mice in different groups. SZZ: SZZ15-11; TAK: TAK875; FBG: Fasting blood glucose; BG increase: Percentage of increasing blood glucose at 30 min after glucose loading (2.0 g \cdot kg $^{-1}$); TC: Blood total cholesterol; TG: Blood triglyceride; BW: Body weight

Group	FBG/mg \cdot dL $^{-1}$	BG increase/%	TC/mg \cdot dL $^{-1}$	TG/mg \cdot dL $^{-1}$	BW/g
Vehicle	246.1 \pm 17.5	77.3 \pm 11.5	111.2 \pm 5.4	135.4 \pm 17.4	46.2 \pm 0.4
SZZ (50 mg \cdot kg $^{-1}$)	229.8 \pm 17.7	78.2 \pm 9.3	108.9 \pm 3.7	131.0 \pm 9.4	45.4 \pm 0.4
SZZ (100 mg \cdot kg $^{-1}$)	233.9 \pm 16.5	77.8 \pm 11.0	107.0 \pm 3.0	127.6 \pm 12.1	45.2 \pm 0.5
TAK (50 mg \cdot kg $^{-1}$)	241.0 \pm 16.2	77.9 \pm 9.8	108.6 \pm 2.4	129.0 \pm 8.6	45.9 \pm 0.5

Table 2 The primer list of genes for RT-PCR

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>Hmgcr</i> (NM_001360165.1)	5'-AGAGAACAAGGGTTCACGCC-3'	5'-CCTTGGATCCCACGCGGA-3'
<i>Abca1</i> (NM_013454.3)	5'-CGACCATGAAAGTGACACGC-3'	5'-AGCACATAGGTCAGCTCGTG-3'
<i>Abcg8</i> (NM_026180.2)	5'-AAGACCCTTGGGCGTTACAG-3'	5'-CCACTGTGAAAGCCGATCCT-3'
<i>Ldlr</i> (NM_001252658.1)	5'-CCAATCGACTCACGGTTCA-3'	5'-ACAGTGTGACTTCTCTAGGC-3'
<i>Cyp27a1</i> (NM_024264.5)	5'-ACAGGAGGGCAAGTACCCAA-3'	5'-AAAGCCTGACGCAGATGGTA-3'
<i>Oatp1a</i> (NM_013797.5)	5'-CAGGGGCATGCAGGATGTAT-3'	5'-GTCTGGAGAGTGGATGTCGC-3'
<i>Oatp1b</i> (NM_020495.2)	5'-AGAAAGCTTGGGTTGTGGGT-3'	5'-TGAATCCATCGCAGTGCCTT-3'
<i>Oatp1c</i> (NM_001177772.2)	5'-TTCTCCGAGGGTTAGGGGAG-3'	5'-GTCTGCACACACCCGATGTA-3'
<i>Ntcp</i> (NM_001177561.1)	5'-TCTTTTATTTGCCACAGCTACA-3'	5'-CATCCTCCGACCCAGTGAAC-3'
<i>Abcc2</i> (NM_013806.2)	5'-ACATCTGCTCCCTTGAGGC-3'	5'-TCGGCTCCGGACTTTTCAA-3'
<i>Abcb11</i> (NM_001363492.1)	5'-GACTTCCACAGTGCGCTCT-3'	5'-AGCAGAGAAGGCCCTACAGA-3'
<i>Acox1</i> (NM_015729.3)	5'-GGAGACAGGTTGTCATCCG-3'	5'-TTCATGACGGAGACCAGTGC-3'
<i>Fgf21</i> (NM_020013.4)	5'-TCTGAACCTGACCCATCCCT-3'	5'-GTCCCAGGGTCCCAACTCTA-3'
<i>Acc</i> (NM_13360.2)	5'-GCTAAACCAGCACTCCCGAT-3'	5'-GTATCTGAGCTGACGGAGGC-3'
<i>Actin</i> (NM_009609.3)	5'-ACTCTCCAGCCTTCCTTC-3'	5'-ATCTCTTCTGCATCCTGTC-3'

诱导培养 48 h。随后,将培养基更换为维持培养基(含 10% FBS、100 μmL^{-1} 青霉素、100 μmL^{-1} 链霉素和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素的 DMEM 高糖培养基),7 天后,细胞分化为成熟脂肪细胞 3T3-L1。然后用含 vehicle 或 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SZZ15-11 的维持培养基预处理细胞 1 h,再加入 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF α 作用 30 min。收集细胞样品用于后续实验。

Western blot 实验 用含有蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液处理肝组织和细胞样品,收集上清,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测样品蛋白浓度,并配制所有样品至相同浓度,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转至 PVDF 膜进行免疫印迹。

统计学分析 GraphPad Prism 8.0 进行绘图和统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用 one-way ANOVA,随后两组间的比较用 t 检验。

结果

1 SZZ15-11 可降低自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的体重

如图 1 所示,与模型组相比,连续给予 SZZ15-11 35 天后,低、高剂量组小鼠的体重均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),阳性化合物 TAK875 也可显著降低小鼠体重 ($P < 0.05$),但其对摄食均无明显影响。

2 SZZ15-11 可缓解自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的高血糖

如图 2A、B,高剂量 SZZ15-11 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 能明显降低小鼠的 NFBG ($P < 0.001$) 和 FBG ($P < 0.01$),但低剂量 SZZ15-11 (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对小鼠的 NFBG 和 FBG 均无显著作用。阳性化合物 TAK875 可显著降低小鼠的 NFBG ($P < 0.01$),对 FBG 无显著作用。

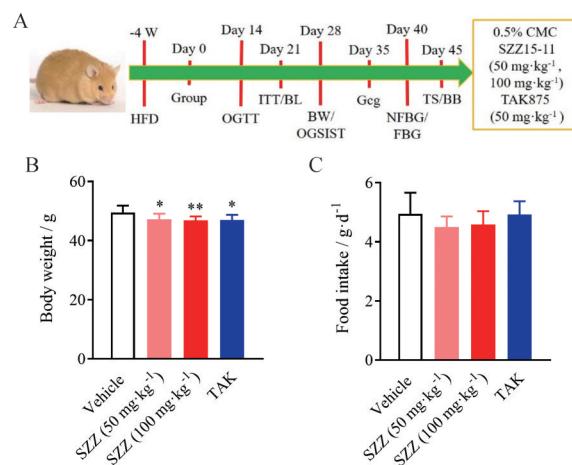


Figure 1 Diagram of animal experiment (A) and effects of SZZ15-11 on body weight (B) and food intake (C) in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle group. Vehicle group, SZZ (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, SZZ (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group and TAK group were given with 0.5% sodium carboxymethylcellulose (CMC), 50 and 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SZZ15-11, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TAK875 respectively through oral gavage. HFD: High fat diet; OGTT: Oral glucose tolerance test; ITT: Insulin tolerance test; BL: Blood lipids; OGSIST: Oral glucose-stimulated insulin secretion test; Geg: Glucagon; NFBG: Non-fasting blood glucose; TS: Tissue sample; BB: Blood biochemistry

3 SZZ15-11 可改善自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的口服葡萄糖耐量

OGTT 实验 (图 2C、D) 中,高剂量 SZZ15-11 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可显著降低小鼠 0 min ($P < 0.05$)、糖负荷后 15 min ($P < 0.001$) 和 30 min 血糖 ($P < 0.05$),阳性化合物 TAK875 可显著降低小鼠糖负荷后 15 min ($P < 0.01$)、30 min ($P < 0.05$) 和 60 min 血糖 ($P < 0.05$),其分别使小鼠血糖 AUC 相较于对照组下降 11.0% ($P < 0.05$) 和 13.9% ($P < 0.05$)。此外,低剂量 SZZ15-11 (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可显著降低小鼠糖负荷后 15 min 血糖

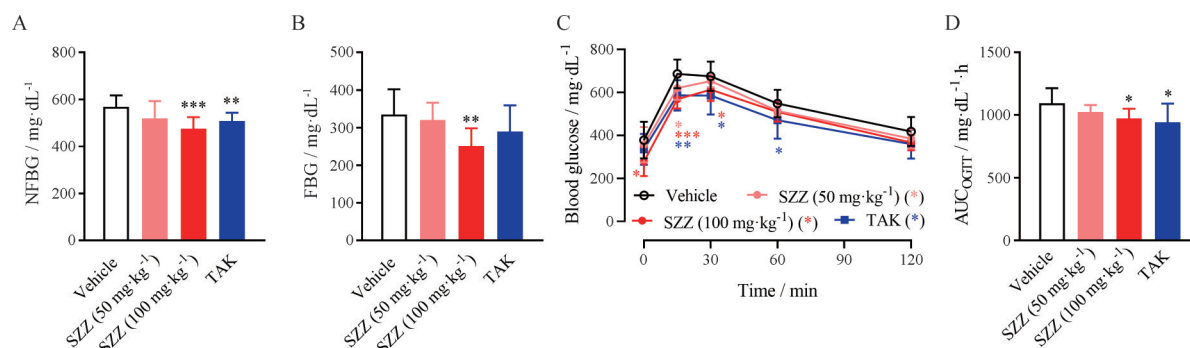


Figure 2 Effects of SZZ15-11 on non-fasting blood glucose (A), fasting-blood glucose (B), blood glucose (C) and area under curve (AUC) (D) of OGTT in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group. NFBG and FBG were tested on day 40. OGTT were executed on day 14, blood samples were harvested at 0, 15, 30, 60 and 120 min after glucose (2.0 g·kg⁻¹) overload

($P < 0.05$), 使小鼠血糖 AUC 相较于对照组下降 6.4%。

4 SZZ15-11 可增强自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的胰岛素敏感性

ITT 实验结果如图 3A、B 所示, SZZ15-11 在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下可有效降低小鼠 0 min ($P < 0.01$)、胰岛素注射后 40 min ($P < 0.01$) 和 90 min ($P < 0.05$) 的血糖, 使小鼠血糖 AUC 相较于对照组减少 32.0% ($P < 0.01$)。但阳性化合物 TAK875 和 50 mg·kg⁻¹ SZZ15-11 均对小鼠胰岛素敏感性无显著作用。

以上结果表明, 化合物 SZZ15-11 在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下能改善自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的糖代谢, 并增强小鼠的胰岛素敏感性。

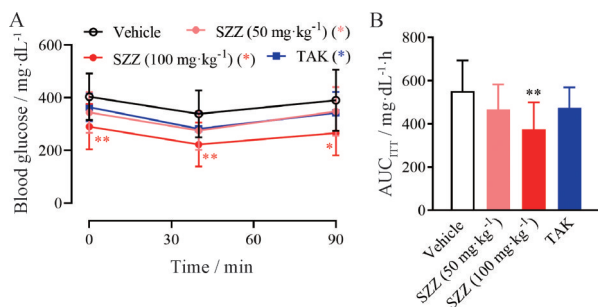


Figure 3 Effects of SZZ15-11 on blood glucose (A) and AUC (B) of ITT in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle group. ITT were carried out on day 21, blood samples were obtained at 0, 40 and 90 min after subcutaneous injection of insulin (0.4 U·kg⁻¹)

5 SZZ15-11 对自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠高血脂的缓解作用

如图 4A、B 所示, SZZ15-11 在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下可显著降低小鼠的血 TG 水平 ($P < 0.05$), 但对血 TC 无明显作用。阳性化合物 TAK875 和 50 mg·kg⁻¹ SZZ15-11 对小鼠的血 TG 和 TC 均无显著影响。表明化合物

SZZ15-11 改善自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的高血脂是以降低血 TG 为主。

6 SZZ15-11 对自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠糖代谢相关血激素水平的影响

小鼠体内血糖变化受胰岛素、胰高血糖素等调节。OGSIST 实验结果如图 4C 所示, 相较于对照组, SZZ15-11 低、高剂量组小鼠的空腹血胰岛素水平均无明显变化, 但糖负荷后 5 min 均显著增加 ($P < 0.001$, $P < 0.05$), 作用与阳性化合物 TAK875 相似。随后检测小鼠的空腹血胰高血糖素, 结果如图 4D 所示, SZZ15-11 在 50 和 100 mg·kg⁻¹ 剂量下均可显著升高小鼠的空腹血胰高血糖素水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 阳性化合物 TAK875 也可增加血胰高血糖素水平 ($P < 0.001$)。提示化合物 SZZ15-11 可有效改善自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的胰岛素、胰高血糖素分泌, 在降血糖的同时, 可能不易引起低血糖。

7 SZZ15-11 对自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠脂肪肝的改善作用

自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的肝组织脂质定量检测显示, 与对照组相比, SZZ15-11 低、高剂量组小鼠肝组织 TG 含量均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 5A), TC 含量无明显改变 (图 5B)。与此同时, SZZ15-11 高剂量组的血 ALT 也显著降低 ($P < 0.05$, 图 5C), 但血 AST 无明显改变 (图 5D)。肝组织病理形态 (HE 染色) 结果显示, SZZ15-11 低、高剂量组小鼠的脂肪肝均有不同程度减轻, 肝细胞空泡变性明显减少 (图 5E)。以上作用均与阳性化合物 TAK875 相似。表明化合物 SZZ15-11 能缓解自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的肝脂肪变性, 改善肝功能。

8 SZZ15-11 可上调肝组织 AMPK α 磷酸化水平

检测分析小鼠肝组织中脂质代谢相关信号通路变化, 发现 SZZ15-11 (100 mg·kg⁻¹) 可显著上调 AMPK α

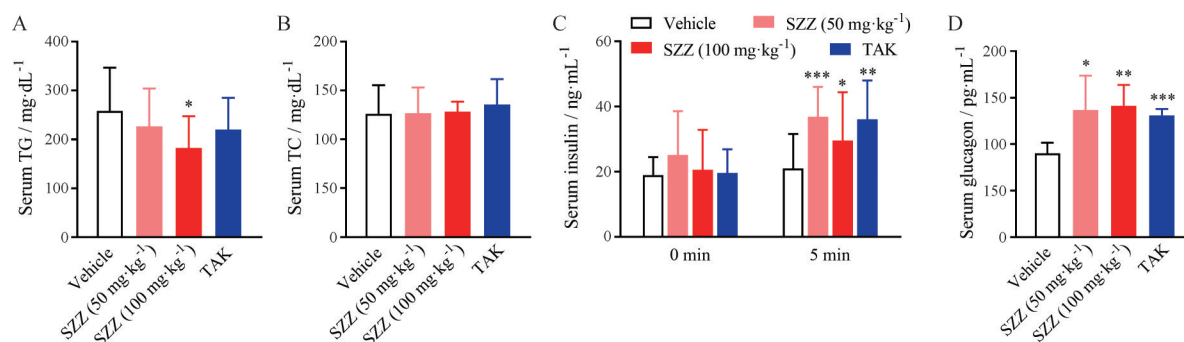


Figure 4 Effects of SZZ15-11 on blood TG (A), TC (B), insulin (C) and glucagon (D) in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group. Blood TG and TC were tested on day 21. OGSIST were examined on day 28, blood samples were used to test insulin at 0 and 5 min after oral gavage of glucose (2.0 g·kg⁻¹). On day 35, blood samples were obtained to test glucagon after fasting for 4 h

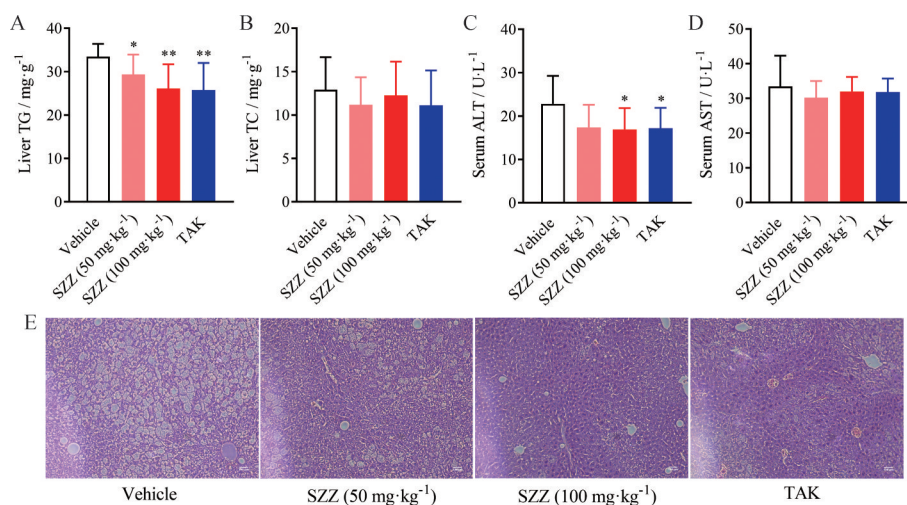


Figure 5 Effects of SZZ15-11 on hepatic TG (A) and TC (B), blood alanine aminotransferase (ALT, C) and aspartate aminotransferase (AST, D), and pathological morphology of liver with hematoxylin-eosin (HE) staining (E) in spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle group. Scale bar of HE staining ($\times 200$) is 100 μm

磷酸化水平 ($P < 0.001$), 使 AMPK α 活性增强 (图 6A、C), 对 HMGCR 表达无明显影响 (图 6A、B)。同时使胆固醇代谢相关基因 *Abcg8* 表达增加 ($P < 0.05$), 胆汁酸转运相关基因 *Abcb11* 表达减少 ($P < 0.05$, 图 6D)。表明化合物 SZZ15-11 可通过增加 AMPK α 活性改善自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠的肝脂肪变性。

9 SZZ15-11 可增强 HepG2 细胞的胰岛素敏感性

如图 7 所示, 在人肝肿瘤细胞 HepG2 中, 胰岛素刺激后 Akt 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$)。同时, SZZ15-11 可使胰岛素作用下细胞中 Akt 磷酸化水平进一步显著增加 ($P < 0.01$), 但对无胰岛素刺激的 HepG2 细胞无明显影响。表明化合物 SZZ15-11 激活了 HepG2 细胞内的胰岛素信号通路, 增强胰岛素敏感性。

10 SZZ15-11 可使 TNF α 抑制脂肪细胞脂联素表达和 Akt 磷酸化的作用明显减弱

脂肪细胞分泌的脂联素可有效增强外周组织的胰

岛素敏感性。利用 TNF α 诱导成熟脂肪细胞 3T3-L1 形成胰岛素抵抗细胞模型, 通过 Western blot 检测发现 TNF α 可显著减少细胞中脂联素表达 ($P < 0.01$), 降低 Akt 磷酸化水平 ($P < 0.01$), 而 SZZ15-11 可明显减弱 TNF α 对脂联素表达的抑制作用 ($P < 0.01$), 增加 Akt 磷酸化水平 ($P < 0.05$, 图 8)。提示化合物 SZZ15-11 可有效改善胰岛素抵抗脂肪细胞模型的状态。

讨论

GPR40 激动剂作为一种新型抗糖尿病候选药物, 在临床上证明可有效控制血糖, 但尚未有化合物获批用于临床治疗^[11]。据报道, GPR40 激动剂 TAK875 因肝毒性终止于临床 III 期试验^[12]。因此, 开发新的安全有效的 GPR40 激动剂仍备受关注。本课题组发现的化合物 SZZ15-11 对 GPR40 的激动活性与 TAK875 接近^[8]。本研究证实了在自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠中,

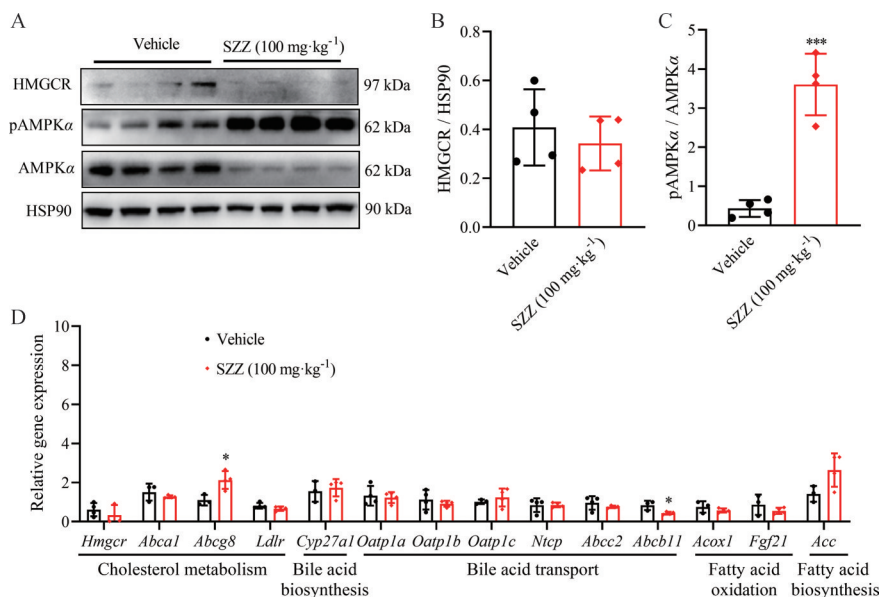


Figure 6 Effects of SZZ15-11 on lipid metabolism-related factors level in liver of spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice. A: Protein lysates of liver tissue in mice of each group were performed with Western blot; B: Quantification of HMG-CoA reductase (HMGCR) expression level; C: Quantification of AMPK α phosphorylation level; D: Lipid metabolism-related genes transcription. $n = 3-4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group

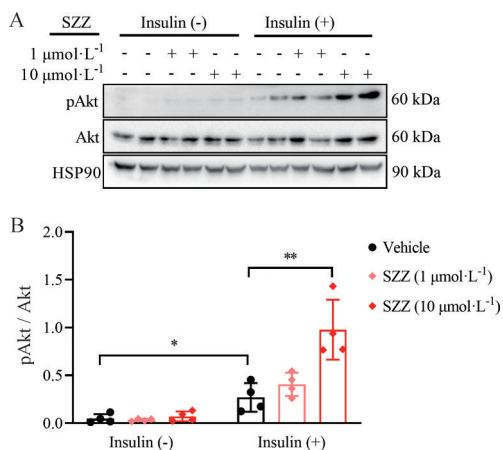


Figure 7 Effect of SZZ15-11 on Akt phosphorylation level in HepG2 cells treated with 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SZZ15-11 under 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ insulin stimulation. A: Protein lysates of HepG2 cells were performed with Western blot; B: Quantification of Akt phosphorylation level. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

SZZ15-11 可改善小鼠的高血糖、高血脂，增强胰岛素敏感性。此外，还可有效缓解小鼠的脂肪肝变性，改善肝功能。

研究表明，激活 GPR40 可促进胰岛素、胰高血糖素和肠促胰岛素类激素分泌^[5,6,13]。本课题组前期研究证实 GPR40 激动剂 SZZ15-11 可促进正常 ICR 小鼠葡萄糖刺激胰岛素分泌和 GLP-1 分泌^[8]。本研究在自发性 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠进一步证实 SZZ15-11 可促进糖负荷后胰岛素分泌，增加空腹胰高血糖素水平。这不仅可预防低血糖的发生，还可能通过胰高血糖素受体调控肝细胞脂质代谢，改善脂肪肝^[14]。

在外周组织中，如肝脏、脂肪、肌肉等，胰岛素与胰岛素受体结合后，可激活下游信号通路，主要通过上调 Akt 磷酸化水平发挥胰岛素功能^[15,16]。本研究在人肝肿瘤细胞 HepG2 证实 SZZ15-11 可通过激活胰岛素信

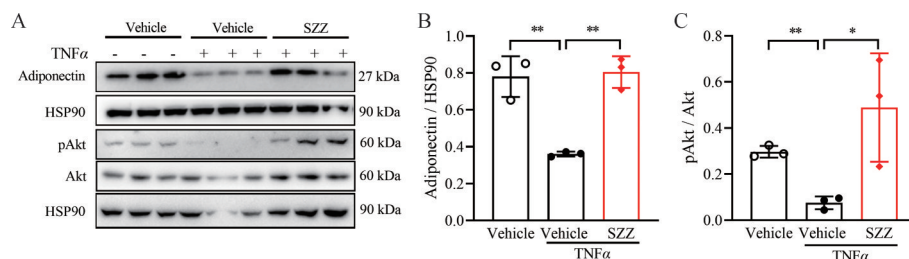


Figure 8 Effect of SZZ15-11 on adiponectin expression and Akt phosphorylation level in mature adipocyte 3T3-L1 treated with 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF α . A: Protein lysates of 3T3-L1 cells were performed with Western blot; B: Quantification of adiponectin expression level; C: Quantification of Akt phosphorylation level. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

号通路,增强胰岛素敏感性,同时可改善TNF α 诱导3T3-L1胰岛素抵抗脂肪细胞模型的状态。但这些作用是否与GPR40受体有直接关系尚需进一步研究。

脂联素作为脂肪因子,主要由白色脂肪组织分泌,其含量减少是肥胖引起胰岛素抵抗或2型糖尿病发生发展的重要因素之一^[17]。其通过脂联素受体可有效调控外周组织的胰岛素敏感性,改善肝细胞的糖脂代谢,降低体重^[18]。TNF α 可使脂肪细胞脂联素表达明显减少^[19]。本研究利用分化成熟的脂肪细胞3T3-L1,研究证实化合物SZZ15-11可减轻TNF α 对脂联素表达的抑制作用,提示SZZ15-11在自发性2型糖尿病KKA^y小鼠的胰岛素增敏和减体重作用可能与脂联素表达增加有关。

化合物SZZ15-11缓解自发性2型糖尿病KKA^y小鼠肝脂肪变性的作用除与胰高血糖素、胰岛素增敏作用和脂联素密切相关外,还与AMPK α 通路活化有关。研究表明,不仅脂联素可上调AMPK α 磷酸化^[20],前期研究也证实GPR40活化与AMPK α 磷酸化有直接关系^[9]。本研究通过提取KKA^y小鼠的肝组织蛋白证实SZZ15-11确可促进AMPK α 磷酸化。此外,还可使胆固醇代谢相关基因*Abcg8*表达增加。但小鼠肝组织脂质定量结果显示SZZ15-11主要影响肝组织TG含量,对TC无明显作用,这与前期DIO小鼠上的结果不一致——SZZ15-11可同时减少DIO小鼠肝组织的TG和TC含量^[9]。可能与SZZ15-11对KKA^y小鼠肝组织HMGCR表达作用不明显有关(图6A、B)。

有研究报道GPR40激动剂TAK875的肝毒性与其抑制胆汁酸转运有关^[21,22]。本研究发现化合物SZZ15-11可使自发性2型糖尿病KKA^y小鼠肝组织胆汁酸转运相关基因*Abcb11*表达下调,提示SZZ15-11是否会影晌小鼠肝细胞胆汁酸转运?虽然研究表明SZZ15-11可降低KKA^y小鼠的血ALT,有效改善肝功能,但在后续研究中,本课题组仍需进一步证实SZZ15-11是否影晌胆汁酸转运,以及SZZ15-11是否存在潜在的毒副作用。

综上所述,SZZ15-11作为新型GPR40激动剂,可有效改善自发性2型糖尿病KKA^y小鼠的糖脂代谢紊乱,可缓解肝脂肪变性,保护肝功能。本研究为SZZ15-11开发成为一种新型、有潜力的抗2型糖尿病候选化合物提供依据。

作者贡献: 雷蕾进行整体实验数据分析并撰写论文;翟佳羽、周甜进行整体实验和数据分析;刘泉、刘率男、曹慧参与体内动物实验;冯存玉、吴敏、陈蕾蕾、雷丽冉参与细胞分子生物学实验;潘璇、刘站柱设计和合成化合物;李彩娜、环

奕指导实验方案设计并修改论文;申竹芳对课题进行指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, et al. Free fatty acid receptors in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100: 171-210.
- [2] Flodgren E, Olde B, Meidute-Abaraviciene S, et al. GPR40 is expressed in glucagon producing cells and affects glucagon secretion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354: 240-245.
- [3] Lu Z, Li Y, Syn WK, et al. GPR40 deficiency is associated with hepatic FAT/CD36 upregulation, steatosis, inflammation, and cell injury in C57BL/6 mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 320: E30-E42.
- [4] Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 11303-11311.
- [5] Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40 [J]. *Nature*, 2003, 422: 173-176.
- [6] Luo J, Swaminath G, Brown SP, et al. A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46300
- [7] Gao XF, Feng CY, Fu YX, et al. The function and drug development progress of free fatty acid receptor 1 in chronic inflammatory diseases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1505-1514.
- [8] Zhou T, Li CN, Huan Y, et al. Primary exploration on antidiabetic effect and mechanism of novel GPR40 agonists SZZ15-11 [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019, 35: 780-785.
- [9] Lei L, Gao X, Zhai J, et al. The GPR40 novel agonist SZZ15-11 improves non-alcoholic fatty liver disease by activating the AMPK pathway and restores metabolic homeostasis in diet-induced obese mice [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2024, 26: 2257-2266.
- [10] Zhang XL, Wang YN, Ma LY, et al. Uncarboxylated osteocalcin ameliorates hepatic glucose and lipid metabolism in KKAy mice via activating insulin signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41: 383-393.
- [11] Li Z, Zhou Z, Zhang L. Current status of GPR40/FFAR1 modulators in medicinal chemistry (2016-2019): a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30: 27-38.
- [12] Kaku K, Enya K, Nakaya R, et al. Efficacy and safety of fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 agonist, in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17:

- 675-681.
- [13] Nishizaki H, Matsuoka O, Kagawa T, et al. SCO-267, a GPR40 full agonist, stimulates islet and gut hormone secretion and improves glycemic control in humans [J]. *Diabetes*, 2021, 70: 2364-2376.
- [14] Kim T, Nason S, Holleman C, et al. Glucagon receptor signaling regulates energy metabolism *via* hepatic farnesoid X receptor and fibroblast growth factor 21 [J]. *Diabetes*, 2018, 67: 1773-1782.
- [15] Kong LJ, Jiang XJ, Li PP. The effects and mechanisms of trimethylamine-*N*-oxide on insulin sensitivity in insulin target cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 3637-3643.
- [16] Chen LL, Lei LR, Cao H, et al. Effects and mechanism of *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids combined with metformin on glucose metabolism in diabetic KKAY mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 3619-3627.
- [17] Straub LG, Scherer PE. Metabolic messengers: adiponectin [J]. *Nat Metab*, 2019, 1: 334-339.
- [18] Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1321.
- [19] He Y, Lu L, Wei X, et al. The multimerization and secretion of adiponectin are regulated by TNF- α [J]. *Endocrine*, 2016, 51: 456-468.
- [20] Choi HM, Doss HM, Kim KS. Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 1219.
- [21] Li X, Zhong K, Guo Z, et al. Fasiglifam (TAK-875) inhibits hepatobiliary transporters: a possible factor contributing to fasiglifam-induced liver injury [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43: 1751-1759.
- [22] Wolenski FS, Zhu AZX, Johnson M, et al. Fasiglifam (TAK-875) alters bile acid homeostasis in rats and dogs: a potential cause of drug induced liver injury [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 157: 50-61.