

二甲双胍对高脂饮食诱导的 2 型糖尿病小鼠 胰岛 β 细胞功能的改善及机制探讨

陈致瑜^{1,2}, 刘率男², 罗振华¹, 孙素娟², 申竹芳^{2*}, 聂瑛洁^{1*}

(1. 贵州省人民医院中心实验室, 贵州 贵阳 550001;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 明确二甲双胍对胰岛 β 细胞的作用并初步考察其作用机制。高脂饮食诱导的 2 型糖尿病 C57BL/6J 小鼠, 按照空腹血糖、胰岛素耐量实验中 40 min 时的血糖下降百分数、甘油三酯、胆固醇及体重 5 个指标分为模型组 (model) 与二甲双胍组 (model+metformin, 200 mg·kg⁻¹), 连续灌胃给药 58 天。采用糖耐量实验与高葡萄糖钳夹技术检测胰岛功能, 并分析胰腺中与增殖、脂质代谢及内质网应激相关因子的 mRNA 及蛋白含量变化。与 model 组相比, 二甲双胍可显著降低 C57 小鼠体重 ($P < 0.01$)、血中甘油三酯与胆固醇水平 ($P < 0.05$); 减少糖耐量实验中时间-血糖曲线下面积 ($P < 0.05$); 增加 C57 小鼠高糖钳夹实验中稳态期葡萄糖输注速率 ($P < 0.05$); 降低空腹血清胰岛素 ($P < 0.05$)。二甲双胍显著上调 C57 小鼠胰腺中与胰腺增殖相关的胰十二指肠同源框因子-1 (*Pdx-1*, $P < 0.01$) 及脂质代谢相关的基因肝 X 受体 β (*Lxr- β* , $P < 0.01$) 的表达。Western blot 结果显示, 与 model 组相比, 二甲双胍组小鼠胰腺中 PDX-1 的蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 内质网应激相关的 PERK 通路中的激活转录因子 4 (ATF4, $P < 0.001$) 和 C/EBP 同源蛋白 (CHOP, $P < 0.05$) 蛋白表达量也较 model 组显著减少。以上结果提示, 二甲双胍可改善 2 型糖尿病 C57BL/6J 小鼠胰岛素分泌功能。其作用机制可能与促进胰腺增殖、改善脂质代谢并缓解胰腺内质网应激状态相关。

关键词: 二甲双胍; C57BL/6J 小鼠; 胰岛 β 细胞功能; 内质网应激; 脂质代谢

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1561-07

The beneficial effect of metformin on beta-cell function of type 2 diabetes mice and its possible mechanisms

CHEN Zhi-yu^{1,2}, LIU Shuai-nan², LUO Zhen-hua¹, SUN Su-juan²,
SHEN Zhu-fang^{2*}, NIE Ying-jie^{1*}

(1. The Central Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550001, China;

2. State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To investigate the effects of metformin on pancreatic β -cell function and its possible mechanism, high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice were divided into two groups according to fasting blood glucose (FBG), glucose decreasing rate at 40 min of insulin tolerance test, triglycerides (TG), cholesterol (CHO) and body weight (BW). The C57 mice were gavaged with water or metformin for 58 days. β -Cell function

收稿日期: 2017-06-29; 修回日期: 2017-07-24.

基金项目: 贵州省人民医院博士基金资助项目 (GZSYBS[2016]03); 黔科合院士站 ([2015]4015); 黔人项目资助 (合同 (2013) 05 号, 黔科合外 G 字 [2014]7020 号).

*通讯作者 Tel: 86-851-85937194, E-mail: nienyj@hotmail.com;

Tel: 86-10-83172669, E-mail: shenzhf@imm.ac.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0631

was evaluated by oral glucose tolerance test and hyperglycemic clamp. Genes and proteins related to pancreas proliferation, lipid metabolism and endoplasmic reticulum stress were investigated. Compared with the model group, metformin group exhibited a reduction in the body weight ($P < 0.01$), plasma TG and CHO ($P < 0.05$), and the area under the curve (AUC) ($P < 0.05$) of glucose tolerance test. The glucose infusion rate during clamp was improved ($P < 0.05$) and the fasting insulin level was decreased in the metformin group ($P < 0.05$). Metformin significantly upregulated the gene expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx-1*, $P < 0.01$) and liver X receptor β (*Lxr- β* , $P < 0.01$). Western blot results showed that, the protein expression of PDX-1 was significantly upregulated ($P < 0.01$). Endoplasmic reticulum stress related protein of activating transcription factor 4 (ATF4, $P < 0.001$) and C/EBP homologous protein (CHOP, $P < 0.05$) were also down-regulated. These results suggest that metformin could improve the insulin secretion function of type 2 diabetic C57BL/6J mice. The mechanism of the action may rely on its improvement of pancreas cell proliferation, lipid metabolism and amelioration of endoplasmic reticulum stress.

Key words: metformin; C57BL/6J mice; pancreatic β -cell function; endoplasmic reticulum stress; lipid metabolism

二甲双胍 (metformin, Met) 是包括美国糖尿病学会、欧洲糖尿病学会、国际糖尿病联盟和中国糖尿病学会等众多权威学会推荐的治疗 2 型糖尿病的一线用药^[1-3]。二甲双胍通过激活 AMPK, 改善肝脏和肌肉的胰岛素抵抗, 是其抗高血糖作用的基础^[4-6]。正常平稳的血糖可减少高血糖对胰岛的毒性作用, 从而改善胰岛 β 细胞功能。然而其对胰岛细胞的直接作用及机制并未进行深入的探讨。

胰岛 β 细胞具有高度发达的内质网, 机体依赖其分泌胰岛素。高糖或高脂情况下, 胰岛素分泌的工作负荷巨大, 导致了内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 的激活并促进了细胞凋亡与糖尿病的发生^[7,8]。

因此, 本研究采用高脂饮食诱导的 2 型糖尿病 C57BL/6J 小鼠, 长期给予二甲双胍, 采用高葡萄糖钳夹技术评价其对胰岛 β 细胞功能的影响, 并检测了胰腺中与胰腺增殖与成熟、脂质代谢相关的基因及内质网应激相关的基因与蛋白变化, 探讨二甲双胍对糖尿病小鼠模型的胰岛 β 细胞功能可能的作用机制, 为其临床合理应用提供依据。

材料与amp;方法

药品与试剂 盐酸二甲双胍片, 澳大利亚艾华

大药厂; 胰岛素 (优泌林, 美国礼来制药公司; 胰岛素 ELISA 试剂盒, ALPCO 公司; Real-time PCR 试剂盒, Takara 公司; PDX-1 (sc-25403)、ATF4 (sc-200)、CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP, sc-575), Santa Cruz Biotechnology 公司; phosphorylated eIF2 α (Ser51, 9721), 美国 Cell Signaling Technology 公司; 内参蛋白 β -actin, Abmart 公司。

动物分组 正常雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号为 SCXK (京) 2002-0003。饲养于中国医学科学院药物研究所动物室 SPF 级动物房。喂养正常饲料至 14 周龄时, 开始给予高脂饮食 (脂肪含量 20%)。高脂喂养 4 个月, 模型即可形成。根据空腹血糖、胰岛素耐量实验中给予胰岛素后 40 min 时的血糖下降百分数、甘油三酯 (triglyceride, TG)、胆固醇 (cholesterol, CHO) 与体重 (body weight, BW) 等 5 个指标将小鼠均匀分为 2 组, 分别为模型组 (model)、二甲双胍组 (model+Met, 每日 200 mg·kg⁻¹), 分组情况见表 1。另取正常雄性 C57 小鼠 10 只作为正常对照组 (control, Con); 模型及给药组, 每组动物各 10 只。给药体积为 0.05 mL/10 g 体质量, 每天给药 1 次, 连续给药 58 天。自第 1 天起每隔 3 日测定 1 次体重。

动物实验和取材 给药第 52 天, 每组取 4~6 只

Table 1 Animal grouping. C57 mice were grouped according to the fasting blood glucose (FBG), blood glucose (BG) decrease at 40 min in the insulin tolerance test (ITT), triglycerides (TG), cholesterol (CHO) and body weight (BW). There is no significance between the two groups. $n = 10$, mean \pm SEM

Group	FBG/mg·dL ⁻¹	BG decrease at 40 min in ITT/%	TG/mg·dL ⁻¹	CHO/mg·dL ⁻¹	BW/g
Model	118.6 \pm 3.4	-21.7 \pm 5.7	67.4 \pm 1.5	239.8 \pm 16.1	48.0 \pm 1.5
Model+Met	117.7 \pm 5.2	-20.0 \pm 6.8	71.8 \pm 4.1	240.4 \pm 20.8	48.0 \pm 1.6

动物进行高血糖钳夹实验, 考察胰岛 β 细胞功能的变化; 动物处死后分离胰腺, 放置于液氮中迅速冷冻, 然后置于低温冰箱保存, 用于检测胰腺生化指标的变化及分子机制探讨研究。第 58 天, 处死每组未做高糖钳夹实验的动物, 组织取材同上, 取胰腺用于免疫组化检测。

腹腔注射葡萄糖耐量实验 (IPGTT) 给药第 49 天, 动物禁食 4 h (自由饮水) 后, 腹腔注射葡萄糖 ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分别于糖负荷前的 0 时, 糖负荷后的 30、60、120 min 尾尖采血 $10 \mu\text{L}$ 。测定血糖与血脂含量。采用葡萄糖氧化酶法测定血糖, 并计算血糖曲线下面积 (AUC), 公式如下:

$$\text{AUC} (\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = (\text{BG}_0 + \text{BG}_{30}) \times 15/60 + (\text{BG}_{30} + \text{BG}_{60}) \times 15/60 + (\text{BG}_{60} + \text{BG}_{120}) \times 30/60$$

(BG_0 、 BG_{30} 、 BG_{60} 、 BG_{120} 分别代表给予葡萄糖负荷后 0、30、60、120 min 的血糖值)。

高血糖钳夹实验 (hyperglycemic clamp technique)

动物禁食 4~6 h 后, 用戊巴比妥钠进行麻醉 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip), 固定于实验台, 经颈总静脉行插管手术以输注葡萄糖。待动物状态平稳后, 开始高糖钳夹实验。尾尖采集血样。经静脉插管并于 1 min 内输注葡萄糖 ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 使小鼠血糖在 5 min 内急剧上升达到较高水平, 之后持续输入 10% 葡萄糖。定期测定血糖, 并根据实时血糖调整葡萄糖输注速率 (glucose infusion rate, GIR)。当血糖平稳且接近 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增加测定频率, 每 5 min 测定一次血糖。当连续 4 次测定血糖值均为 $14 \pm 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 即达到钳夹稳态期。取 0、5、10、15 min 及钳夹稳态期时的血样用于测定胰岛素水平。胰岛素含量用 ELISA 方法测定。实验中 GIR 值代表了胰岛 β 细胞的功能, 其计算公式为 $\text{GIR} (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{葡萄糖输注速率} (\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}) \times 100 (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) \div \text{体重} (\text{g})$ 。

胰腺病理形态 待血糖钳夹实验结束后, 处理剩余的动物, 分离胰腺, 生理盐水冲洗。拭干后, 取胰尾部分用 Bourin's 液固定, 常规石蜡包埋, $5 \mu\text{m}$ 切片, 进行 HE 染色。

胰腺组织中增殖、胆固醇代谢及内质网应激相关因子 mRNA 与蛋白表达水平检测

mRNA 表达水平的检测 取胰腺组织 100 mg, 加入 Trizol 裂解。目的基因扩增的采用两步法, 预变性, 95°C 30 s, 95°C 5 s \rightarrow 60°C 31 s, 40 个循环。测定各基因的溶解温度 C_t 值, 并将各个样本的 C_t 值与其内参基因 β -actin 的 C_t 值通过数据处理计算出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,

使数据统一化, 比较目的基因的组间差异。目的基因引物序列如下: 胰十二指肠同源框因子-1 (*Pdx-1*), 5'-CCC GAATGGAACCGAGCCT-3' (F), 5'-CCCGAG GTCACCGCACAAT-3' (R); 肝 X 受体蛋白 β (*Lxr-\beta*), 5'-AAGGACTTCACCTACAGCAAGGA-3' (F), 5'-AAGGACTTCACCTACAGCAAGGA-3' (R)。

蛋白表达水平的检测 胰腺组织约 100 mg, 加入蛋白裂解液, 超声匀浆, 充分裂解, 冰浴放置。离心后取上清, 获得总蛋白样品。采用 Western blot 检测目的蛋白。

统计学处理 数据采用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 二甲双胍对 C57 小鼠体质量的影响

自给药第 4 天起, model+Met 组小鼠的体质量呈下降趋势。自给药第 16 天起, model+Met 组体质量与 model 组相比显著下降 (图 1, $P < 0.05$)。第 43 天起, 体重下降趋势更加明显 ($P < 0.01$)。结果提示, 二甲双胍对体质量有显著的减轻作用。

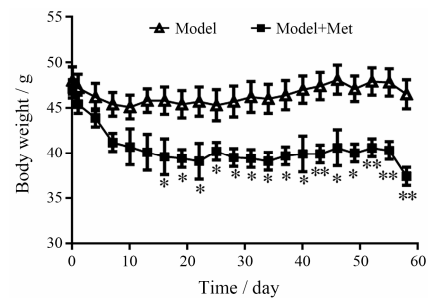


Figure 1 Body weight of C57 mice were recorded every three days during 58 days treated with vehicle or metformin (Met, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig, once daily). $n=8-10$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

2 二甲双胍对 C57 小鼠血脂的影响

给药第 49 天, 二甲双胍显著降低胰岛素抵抗小鼠的血浆 TG (表 2, $P < 0.05$) 与总 CHO ($P < 0.05$), 提示二甲双胍对血脂的调节与脂质代谢紊乱的改善作用。

Table 2 Plasma lipid levels in C57 mice after 49 days of treatment of metformin. $n=8-10$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs Con group; * $P < 0.05$ vs model group

Group	TG/mg·dL ⁻¹	CHO/mg·dL ⁻¹
Con	68.0 ± 3.7	55.0 ± 13.1
Model	92.8 ± 6.8 [#]	167.4 ± 10.2 ^{###}
Model+Met	73.0 ± 3.5 [*]	137.9 ± 6.5 [*]

3 二甲双胍对 C57 小鼠葡萄糖耐量的改善作用

给药第 49 天, 腹腔注射葡萄糖并测定 C57 小鼠的糖耐量。Model 组小鼠 0 时血糖与 Con 组相比, 无显著差异 (表 3)。Model+Met 组 0 时血糖显著低于 model 组 ($P<0.01$), 30 min 时的血糖及时间-血糖曲线的 AUC 显著低于 model 组 ($P<0.05$), 提示二甲双胍治疗后的 C57 小鼠胰岛 β 细胞功能有所改善。

4 二甲双胍对 C57 小鼠糖刺激胰岛素分泌功能的影响

至钳夹实验稳态期时, 各实验组的血糖均值均已调节至 $14\pm 0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2A)。在维持相同稳态血糖水平下与 model 组小鼠相比, model+Met 组的 GIR 值显著增加, 增长率为 77.7% ($P<0.05$, 图 2B)。表明给予二甲双胍治疗后, C57 小鼠胰岛 β 细胞对葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应性有所增加, 胰岛素分泌功能增强。二甲双胍组空腹血清胰岛素显著低于模型组, 提示胰岛素抵抗状态得以缓解 (图 2C, $P<0.05$)。二

甲双胍组给予葡萄糖刺激后, 胰岛素的一相 (图 2D, $P<0.001$) 及钳夹稳态期的胰岛素分泌的增加比率显著高于模型组 (图 2D, $P<0.05$)。上述结果提示: 长期给予二甲双胍能显著改善 C57 小鼠糖刺激的胰岛素分泌功能。

5 二甲双胍对 C57 小鼠胰岛形态的影响

通过 HE 染色可以观察到, 与 Con 组 (图 3A) 相比, model 组 C57 小鼠的胰岛中会出现脂肪空泡、血肿及一定程度的炎性浸润, 胰岛边缘形态不规则化 (图 3B)。给予二甲双胍后, 胰岛中脂肪空泡缩小、囊肿和血肿明显减少, 胰岛形态规则化 (图 3C)。上述结果提示, 二甲双胍可一定程度恢复 2 型糖尿病 C57 小鼠的胰岛形态。

6 二甲双胍对 C57 小鼠胰腺增殖、发育和脂质及能量代谢关键因子 mRNA 表达水平的影响

Pdx-1 是胰腺发育、成熟和分化的重要调节基因。Model 组 C57 小鼠胰腺中 *Pdx-1* 显著低于 Con 组, 提

Table 3 Plasma glucose level and area under the curve (AUC) of intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) after 49 days treatment of metformin. After 4 h of fasting, the mice were injected with $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ glucose. Glucose at 0, 30, 60 and 120 min were tested and the AUC was calculated according to glucose levels. $n=8-10$, mean \pm SEM. $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs Con group; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs model group

Group	Glucose/ $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$				AUC/ $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
	0 min	30 min	60 min	120 min	
Con	114.7 ± 4.2	175.8 ± 3.7	149.8 ± 3.4	128.2 ± 3.9	293.0 ± 5.0
Model	119.2 ± 4.8	$221.0 \pm 13.6^{\#\#}$	$201.0 \pm 17.0^{\#}$	148.5 ± 11.6	$366.0 \pm 25.6^{\#}$
Model+Met	$96.3 \pm 5.1^{**}$	$171.7 \pm 13.9^*$	150.5 ± 13.5	126.4 ± 6.4	$286.0 \pm 20.0^*$

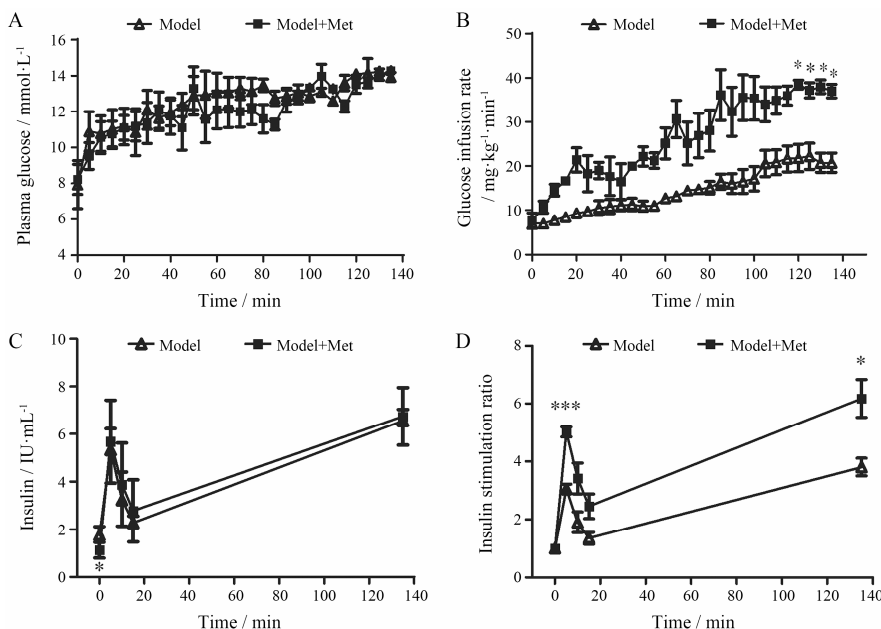


Figure 2 The β -cell sensitivity to glucose in C57 mice is improved after treatment of metformin. A: Plasma glucose; B: Glucose infusion rate; C: Plasma insulin level; D: Insulin stimulation ratio during the hyperglycemic clamp in C57 mice treated with vehicle or metformin for 52 days. Mice were fasted for 4-6 h before the experiment. $n=4-5$, mean \pm SEM. $^*P<0.05$, $^{***}P<0.001$ vs model group

示该模型的胰腺增殖及胰岛素合成能力减低; 二甲双胍能显著上调 C57 小鼠胰腺中 *Pdx-1* 的 mRNA 表达 (图 4A, $P < 0.01$)。Model 组小鼠胰腺中胆固醇代谢关键基因 *Lxr- β* 的 mRNA 表达较 Con 组显著减少, 表明该模型动物胰腺中存在胆固醇代谢紊乱状态 (图 4B, $P < 0.001$)。二甲双胍能显著上调胰腺内 *Lxr- β* 的 mRNA 表达水平 (图 4B, $P < 0.01$)。上述结果提示: 二甲双胍可能通过促进胆固醇代谢和胰腺增殖, 从而改善 C57 小鼠的胰岛 β 细胞功能。

7 二甲双胍对 C57 小鼠胰腺增殖及内质网应激相关蛋白的影响

Western blot 结果显示 (图 5A), 与 Con 组相比,

model 组小鼠胰腺中的 PDX-1 蛋白表达水平显著降低 (图 5B, $P < 0.01$); 内质网应激相关因子, 包括 PERK 通路中的磷酸化 eIF2 α ($P < 0.01$), 及其下游的 ATF4 ($P < 0.01$) 和 CHOP ($P < 0.01$) 蛋白表达量较 Con 组显著增加 (图 5C~E), 提示 C57 小鼠胰腺存在典型的内质网应激。与 model 组相比, model+Met 组小鼠胰腺中的 PDX-1 蛋白表达显著增加 (图 5B, $P < 0.01$); PERK 通路中的 eIF2 α 磷酸化水平有所降低, 但无显著差异 (图 5C, $P = 0.10$), 其下游的 ATF4 (图 5D, $P < 0.001$) 和 CHOP (图 5E, $P < 0.05$) 蛋白表达量也较 model 组显著减少。该结果提示, 二甲双胍对 C57 小鼠的内质网应激状态的缓解可能主要是通过调节

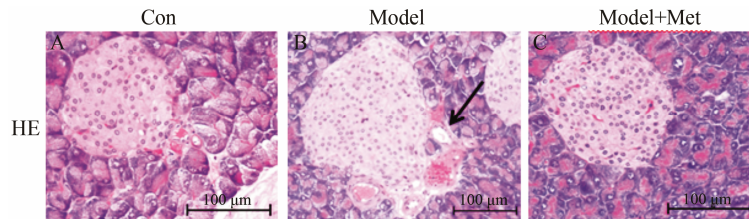


Figure 3 The effects of metformin on histopathological morphology of the pancreas of C57 diabetic mice. A: Control group; B: Model group; C: Model+Met group. Arrow, fat droplet and fibroblast. HE, hematoxylin and eosin staining

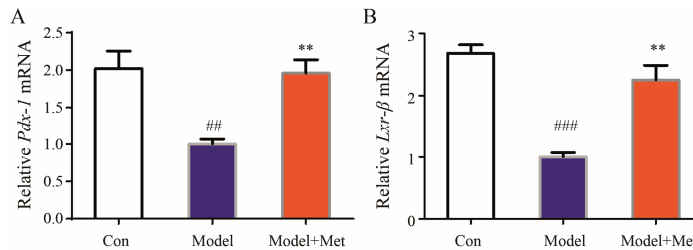


Figure 4 *Pdx-1* (A) and *Lxr- β* (B) mRNA levels. Total RNA was extracted from pancreas of C57 mice and analyzed by real-time PCR. Results are means \pm SEM determined from three experiments performed in triplicate or quadruplicate and are expressed as fold-change of mRNA levels in control C57 mice pancreas. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Con group; ** $P < 0.01$ vs model group

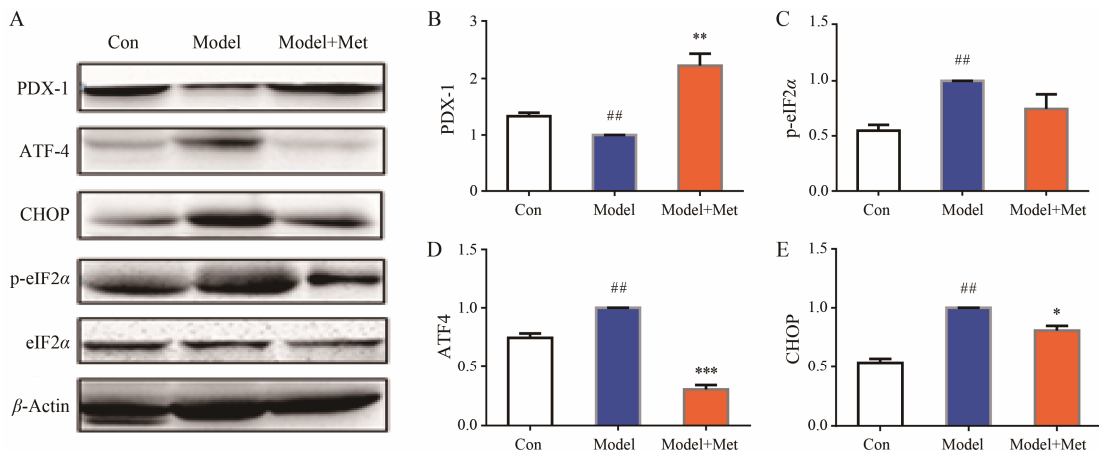


Figure 5 Western blot analysis (A) comparing changes in pancreatic protein expression of PDX-1 (B), phosphorylated eIF2 α (C), ATF4 (D) and CHOP (E) of C57 mice. Total eIF2 α and β -actin protein served as loading controls. All the bands were quantified by densitometry and are expressed as fold change compared with control. $n = 3-4$, mean \pm SEM. ## $P < 0.01$ vs Con group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

PERK 通路中的 ATF4 与 CHOP 实现。

讨论

2 型糖尿病患者的血糖水平可通过运动和合理饮食加以干预。但对大部分人群而言, 药物干预是最有效的方式。与其他降糖药相比, 二甲双胍的优越性在于很少引起低血糖, 体质量增加。因此, 2017 年版《美国糖尿病学会指南》给出的建议为^[1]: 2 型糖尿病患者一旦确诊, 应当立即服用二甲双胍。此外, 近年来多项研究报道了二甲双胍的多重作用, 如对癌症及心血管疾病的益处^[9, 10]。因此, 探讨其作用机制对解释其多重作用及指导联合用药意义深远。

本研究采用了高葡萄糖钳夹技术测定胰岛细胞功能。该技术是评价胰岛细胞功能的金标准^[11]。实验中得到的胰岛素分泌曲线及 GIR 值, 能够体现胰岛素的双相分泌及最大分泌量。本研究中的结果显示, 二甲双胍能够显著增加高葡萄糖钳夹实验中的 GIR 值 ($P < 0.05$), 并可增加静脉葡萄糖刺激后一相的胰岛素分泌量 ($P < 0.001$) 和钳夹稳态时的 β 细胞的最大分泌能力 ($P < 0.05$)。表明二甲双胍能使 C57 小鼠 β 细胞对葡萄糖刺激的反应性增强, 胰岛素分泌能力增加。

因此, 后续实验探索了上述观察到的二甲双胍改善作用的可能机制。实时荧光定量 PCR 结果显示, 二甲双胍可显著上调 C57 小鼠胰腺中 *Pdx-1* ($P < 0.01$) 与 *Lxr- β* ($P < 0.01$) 基因的表达。*Pdx-1* 是促进胰腺发育和胰岛细胞分化的重要调节因子^[12], 上述结果提示二甲双胍可一定程度促进胰腺的增殖。此外, 肝 X 受体 (LXR) 是一个核激素受体, 其主要作用是感应和调节机体的胆固醇稳态^[13, 14]。本研究中的结果提示二甲双胍可能通过改善脂质代谢从而增强 C57 小鼠胰岛细胞功能。

内质网应激可激活 3 条信号通路, 包括 IRE1 α 、PERK 及 ATF6 通路。短期的内质网应激可缓解胞内错误折叠蛋白堆积的压力, 然而长期的内质网应激状态则会诱导细胞凋亡。PERK 通过形成二聚体可使 eIF2 α 磷酸化, 后者可以阻止 eIF2/GTP/Met-tRNA_i 翻译起始复合物的形成而抑制蛋白质的合成, 从而减少蛋白质在内质网腔内的堆积。eIF2 α 长期活化可激活下游的 ATF4, 并启动 CHOP 诱导的凋亡^[15]。

本研究考察了 PERK 通路中相关蛋白的变化。结果显示, 二甲双胍可通过下调 PERK 通路中的 eIF2 α 的磷酸化、ATF4 和 CHOP 蛋白的表达, 增加胰岛素

合成相关因子 PDX-1 的表达, 一定程度缓解 C57 小鼠胰岛细胞中内质网应激状态。上述结果表明, 二甲双胍很可能通过作用于 PERK 通路, 调节 eIF2 α -ATF4-CHOP 而改善 C57 小鼠的胰岛 β 细胞功能。

此外, 本研究并未考察二甲双胍对内质网应激的另两条通路: ATF6 与 IRE1 α 的影响。因此, 二甲双胍对胰岛细胞的益处不能排除对这两条通路的调控, 这是本研究的局限之一。因此, 今后的研究会更加全面及深入探讨二甲双胍对这两条通路的调控, 并采用基因沉默等手段的干预, 明确内质网应激在二甲双胍对胰岛细胞的功能影响中扮演的角色。

综上所述, 二甲双胍可改善 2 型糖尿病小鼠 C57BL/6J 胰岛细胞对葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 增加其胰岛素分泌功能。其机制可能与促进胰腺增殖与脂质代谢, 缓解内质网应激压力有关。然而, 对内质网应激通路的干预是直接或间接作用, 仍然有待后期的探索与阐明。

References

- [1] Chamberlain JJ, Herman WH, Leal S, et al. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes: synopsis of the 2017 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166: 572–578.
- [2] Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35: 1364–1379.
- [3] Mu YM, Ji LN, Ning G, et al. Chinese experts consensus statement on metformin in the clinical practice: 2016 updated [J]. *Chin J Diabetes (中国糖尿病杂志)*, 2016, 24: 871–884.
- [4] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 1167–1174.
- [5] Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Rodríguez-Hermosa JI, et al. OCT1 expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects [J]. *Diabetes*, 2011, 60: 168–176.
- [6] Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, et al. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment [J]. *Lancet*, 2011, 378: 182–197.
- [7] Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to β cell apoptosis in type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2007, 50: 752–763.
- [8] Haataja L, Manickam N, Soliman A, et al. Disulfide

- mispairing during proinsulin folding in the endoplasmic reticulum [J]. *Diabetes*, 2016, 65: 1050–1060.
- [9] Anabtawi A, Miles JM. Metformin: non-glycemic effects and potential novel indications [J]. *Endocr Pract*, 2016, 22: 999–1007.
- [10] Burla AK, Lobato NS, Fortes ZB, et al. Cardiac fibrosis and vascular remodeling are attenuated by metformin in obese rats [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165: 483–487.
- [11] DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance [J]. *Am J Physiol*, 1979, 237: E214–E223.
- [12] Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, et al. Insulin protects islets from apoptosis *via* Pdx1 and specific changes in the human islet proteome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 19575–19580.
- [13] Li X, Zhang S, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR [J]. *Mol Cell*, 2007, 28: 91–106.
- [14] Nomiya T, Bruemmer D. Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2008, 10: 88–95.
- [15] Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29: 42–61.