

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002778

二甲双胍对 1 型糖尿病幼鼠胰岛 β 细胞的作用机制研究

马梦瑾, 罗臻臻, 李志洁

(郑州大学第二附属医院社区及预防保健科, 郑州 450000)

【摘要】目的:探讨二甲双胍(metformin, Met)对 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)幼鼠胰岛 β 细胞功能的影响及可能的作用机制。**方法:**将健康幼鼠分为对照组(Control 组)12 只、诱导 1 型糖尿病模型组(T1DM model 组)24 只以及诱导 1 型糖尿病后 Met 给药组(T1DM+Met 组)24 只。采用葡萄糖耐量实验、胰岛素耐量实验及高葡萄糖钳夹技术检测胰岛功能;HE 染色观察胰岛形态;胰岛素和 Ki67 免疫荧光双染法测 β 细胞增殖率;TUNEL 法检测 β 细胞凋亡;Western blot 检测胰腺组织中胰岛素促进因子 1(pancreatic duodenal homeobox 1, PDX-1)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)及内质网应激相关因子的蛋白水平;RT-qPCR 检测胰腺组织中炎症相关因子的 mRNA 水平。**结果:**Met 可降低 T1DM 幼鼠空腹血糖和胰岛素水平,改善糖耐量异常和胰岛素敏感性。Met 可使高葡萄糖钳夹实验中的葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)、静脉葡萄糖刺激后 1 min 的胰岛素分泌量和钳夹稳态时的胰岛 β 细胞最大分泌能力明显增加。Met 可使胰岛形态在一定程度上得到恢复。Met 可通过促进 PDX-1 和 Bcl-2 蛋白水平的表达进而促进 β 细胞增殖,抑制其凋亡。Met 能明显下调磷酸化真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 alpha, eIF2 α)、活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)及 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)的表达($F=81.322, 215.372, 55.059$, 均 $P=0.000$),也能明显下调核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 水平($F=570.275, 369.184, 474.006$, 均 $P=0.000$)。**结论:**Met 可通过促分化、抗凋亡、缓解内质网应激压力及降低炎症反应,进而改善 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞的分泌功能,并能促进其增殖以及恢复胰岛形态。

【关键词】二甲双胍;1 型糖尿病;胰岛 β 细胞;机制**【中图分类号】**R725.8**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-07-15Mechanism of action of metformin on islet β cells in type 1 diabetic rats

Ma Mengjin, Luo Zhenzhen, Li Zhijie

(Department of Community and Preventive Health Care, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of metformin (Met) on islet β -cell function in young rats with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and its possible mechanisms of action. **Methods:** Healthy young rats were recruited in this study, 12 in Control group, 24 in induced type 1 diabetes model (T1DM model) group, and 24 in Met administration group (T1DM+Met group) after induction of T1DM. Glucose tolerance test, insulin tolerance test and high glucose clamp technique were used to detect islet function. The morphology of islet was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Insulin and Ki67 immunofluorescence double staining method was used to determine the proliferation rate of β cells. Apoptosis of β cells was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) assay. Western blot was used to detect the protein levels of pancreatic duodenal homeobox 1 (PDX-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and endoplasmic reticulum stress-related factors in pancreatic tissue. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect mRNA levels of inflammation-related factors in pancreatic tissue. **Results:** Met could reduce the fasting blood glucose and insulin levels of T1DM young rats, and improve the abnormal glucose tolerance and insulin sensitivity. Met significantly increased the glucose infusion rate (GIR) value, the insulin secretion 1 min after intravenous glucose stimulation, and the maximum secretion capacity of islet β cells in the clamp steady state in the high glucose clamp experiment. Met restored the islet morphology to a certain extent, promoted β cells proliferation and inhibited their apoptosis by promoting the expression of PDX-1 and Bcl-2 protein levels. Met significantly down-regulated the expression of phosphorylated

eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α), eukaryotic initiation factor 4 (ATF4) and C/EBP-homologous protein (CHOP) ($F=81.322, 215.372, 55.059$, all $P=0.000$), and also significantly down-regulated the mRNA levels of nuclear factor kappa-B (NF- κ B), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α

作者介绍: 马梦瑾, Email: ckg6km@163.com,

研究方向: 小儿内分泌。

通信作者: 李志洁, Email: 13523588009@163.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210412.1726.010.html>

(2021-04-13)

(TNF- α) ($F=570.275, 369.184, 474.006$, all $P=0.000$). **Conclusion:** Met can improve the secretion function of islet β cells in type 1 diabetic rats by promoting differentiation, anti-apoptosis, relieving stress of endoplasmic reticulum stress and reducing inflammation, thereby promoting its proliferation and restoring islet morphology in young rats with T1DM.

[Key words] metformin; type 1 diabetes mellitus; islet β cell; mechanism

近年来,糖尿病的发病率随着人们经济和生活水平的提高而不断升高,严重影响人类的健康和生存。因胰岛素分泌缺陷、脂肪代谢紊乱及生物学功能障碍引起的以高血糖为特征的代谢性疾病即为糖尿病,主要临床症状为三多一少,即多食、多饮、多尿和消瘦。作为糖尿病的 4 种类型之一,1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)通常被认为是在 T 细胞介导下导致胰岛 β 细胞出现特异性损伤,进而使胰岛素的分泌绝对减少,且于青少年时期多发的自身免疫性疾病^[1-2]。 β 细胞在正常生理条件下仅于胚胎期及新生儿发育期发生增殖、分化。由于健康成年个体的 β 细胞寿命很长从而降低了其增殖水平,当机体处于病理状态或遭受严重损伤时, β 细胞能够重新获得增殖能力及通过其他细胞的分化以补充有功能的胰岛 β 细胞^[3-4]。目前,二甲双胍(metformin, Met)是国内外公认的治疗 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的一线口服药物,能显著改善小鼠 β 细胞功能紊乱和胰岛素分泌^[5-6]。尽管有关于 Met 治疗 T1DM 的相关文献报道,但很少有对 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞作用机制的报道。因此,本研究采用链脲佐菌素诱导 T1DM C57B/L6 幼鼠模型,以探讨 Met 对其胰岛 β 细胞的可能作用机制,进而为临床合理用药提供可靠的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及主要仪器

首次妊娠的 15~18 日龄 SPF 级 C57B/L6 孕鼠,购自上海斯莱克实验动物有限公司,于 20~24℃,50%~60%湿度的动物房内饲养。给予普通饲料,让其自由饮水饮食。盐酸二甲双胍片(0.5 g,批号 A114L)为澳大利亚艾华大药厂产品;胰岛素(优泌林)为礼来制药公司产品;链脲佐菌素购自 Sigma,用新配制的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液将其溶解为 100 mg/kg、pH=4.5 的溶液。小鼠抗胰岛素一抗(E11D7)、兔抗 Ki67 一抗(#2382594)、Bcl-2 一抗(AB1722)均购自美国 Merck Millipore;PDX-1 一抗(2437)和 Phosphorylated eIF2 α (Ser51,9721)购自美国 Cell Signaling Technology;ATF4(sc-200)、CHOP

(sc-575)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;TRITC 标记山羊抗小鼠荧光二抗、FITC 标记山羊抗兔荧光二抗均购自北京中杉金桥;内参蛋白 β -actin 购自 Abmartabcam 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术研究;胰岛素(INS)ELISA 试剂盒(c E90448Ra)购于武汉优尔生;一步法 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(KGA7071)购自江苏凯基。

所需仪器为 Leica 石蜡切片机、Carl Zeiss AG 激光共聚焦显微镜、B. Braun Melsungen AG 贝朗血糖仪、伯乐酶标仪、ABI7000 PCR 仪、Sigma 3-18K 型低温高速离心机、哈尔滨东明医疗仪器厂 HZQ-C 空气浴震荡器。

1.2 实验动物模型建立

将出生后的健康幼鼠分为对照(Control)组、1 型糖尿病模型(T1DM model)组和 1 型糖尿病二甲双胍处理(T1DM+Met)组,其中 Control 组 12 只,其余 2 组每组 24 只。Control 组:建立 T1DM 模型时,于相同时间采取相同方法注射等体积枸橼酸缓冲液;T1DM model 组:于幼鼠出生后 10 h 内经腹腔一次性注射配制好的链脲佐菌素溶液进行诱导;T1DM+Met 组:T1DM 模型建立成功的幼鼠按照 0.2 g/kg 体质量的剂量给予盐酸二甲双胍水溶液,其余 2 组均给予等体积蒸馏水,连续灌胃 12 周,每天 1 次。

1.3 葡萄糖耐量实验

给药第 35 天,实验幼鼠禁食 4 h,以 2.0 g/kg 的负荷腹腔注射葡萄糖,分别于糖负荷前 0 min,负荷后 30 min、60 min 和 120 min 尾尖采血各 10 μ L,采用葡萄糖氧化酶法进行血糖值测定,并计算血糖曲线下面积。

1.4 胰岛素耐量实验

给药第 49 天,实验幼鼠禁食 4 h,将常规胰岛素溶液以 0.4 U/kg 进行皮下注射,分别于注射前 0 min,注射后 40 min、90 min 采集血样,对各时间点的血糖值进行测定,计算 40 min 血糖下降百分数和血糖曲线下面积。

1.5 高葡萄糖钳夹实验

给药第 70 天,实验幼鼠禁食 6 h 后,按照 80 mg/kg 体质量腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,并于实验台固定。高糖钳夹实验开始前断尾采血备用,以测定空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)和血糖(fasting blood glucose, FBG)水平。后行颈静脉插管手术以 100 mg/kg 体质量的初始剂量输注葡萄糖,分别于第 1 min、5 min、10 min 及 15 min 尾尖采血以测定第一时相胰岛素水平,之后开启蠕动泵持续输入 10%葡萄糖,使血糖水平处于钳夹稳态期,取 5 个时间点的葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)平均值作为稳态期 GIR。

此外,分别于高糖钳夹实验开始后第 60 min、90 min、120 min 及 180 min 采血,采用 ELISA 法测定胰岛素分泌量并绘制曲线。胰岛 β 细胞的功能,即胰岛素的分泌能力和 β 细胞对葡萄糖的反应性用 GIR 值进行判断,计算公式: $GIR[mg/(kg \cdot min)] = \text{葡萄糖输注速率}(mL/min) \times 100(mg/mL) \div \text{体质量}(kg)$ 。

1.6 胰腺病理形态的观察

高葡萄糖钳夹实验结束后,将剩余实验动物处死,分离出胰腺并用生理盐水冲洗,拭干后,用 Bourin's 液固定胰尾部分,常规石蜡包埋,连续 5 μm 切片后采用 HE 染色。

1.7 β 细胞增殖率检测

将胰腺组织用 4%多聚甲醛于 4℃固定 24 h,流水冲洗后依次梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,之后用切片机进行切片,脱蜡,梯度乙醇水化,置于 0.01 mmol/L 柠檬酸修复液中进行微波修复,微波起计时 10 min,冷却后再次修复,1%牛血清白蛋白(albumin from bovine serum,BSA)的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)封闭液室温孵育 2 h 后,加小鼠抗胰岛素一抗和兔抗 Ki67 一抗,均按 1:1 000 的比例稀释到同一封闭液中,4℃过夜孵育,PBS 洗涤干净后,滴加稀释好的四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate,TRITC)标记山羊抗小鼠荧光二抗和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记山羊抗兔荧光二抗,室温孵育 2 h,PBS 洗涤,甘油封片,置于荧光显微镜下观察,并用 Image J 软件计数荧光共染细胞。

1.8 β 细胞凋亡率检测

石蜡切片常规脱蜡,梯度乙醇水合,PBS 洗涤,滴加 100 μL 蛋白酶 K 工作液至每个组织切片上,并于 37℃作用 30 min,取一张样本片滴加 100 μL 配制好的脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I,DNase I)反应液,37℃作用 30 min 后加 PBS 洗涤干净。避光加入 100 μL 配制好的 TUNEL 混合反应液,37℃避光作用 30 min,同时采用小鼠抗胰岛素抗体染色进行定位,加 PBS 洗涤,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)复染细胞核,室温避光 10 min,冲洗后封片,置于荧光显微镜下观察,并用 Image J 软件进行染色细胞计数。

1.9 胰腺组织中增殖、抗凋亡及内质网应激相关蛋白水平的检测

采用英文特公司的动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒收集胰腺组织中总蛋白,以 BCA 试剂盒测定蛋白含量,加上样缓冲液煮沸制备蛋白电泳样品,之后进行十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),依次转膜,封闭,分别加稀释好的胰岛素促进因子 1(pancreatic duodenal homeobox 1,PDX-1)一抗、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)一抗、真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 alpha,eIF2 α)及活化转录因子 4(activating transcription factor 4,ATF4)和 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)一抗,4℃冰箱孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液(phosphate tween buffer,PBST)洗膜,干净后再加相应的 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h,PBST 洗膜,加电化学发光(electro-chemi-luminescence,ECL)液进行显色,暗室曝光拍照,同时以 β 肌动蛋白(β -actin)作为内参蛋白。

1.10 胰腺组织中炎症相关因子 mRNA 水平的检测

收集 3 组幼鼠胰腺组织,每只各取约 100 mg,采用 Trizol 法提取各组织样本中的总 RNA,之后经逆转录获取 cDNA,以得到的该 cDNA 为模板,采用 RT-qPCR 分别检测炎症通路相关因子核因子- κB (nuclear factor kappa-B,NF- κB)、白介素-6(interleukin 6,IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)的表达情况,同时以 β -actin 作为内参基因。每个样本每个指标均重复进行 3 次实验。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。正态计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析用于多组间比较,独立 t 检验用于 2 组间比较;软件 Image J 用于荧光统计,Graph-Pad Prism 5 用于作图。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Met 对 T1DM 幼鼠腹腔注射葡萄糖耐量的影响

方差分析 3 组幼鼠空腹血糖、腹腔注射葡萄糖后 3 个时间点血糖水平以及血糖曲线下面积,差异均有统计学意义($F=272.000$ 、209.978、161.901、153.215、17.480,均 $P=0.000$)。T1DM model 组相比 Control 组显著升高($t=28.596$ 、25.481、17.899、18.141、5.541,均 $P=0.000$),T1DM+Met 组明显低于 T1DM model 组($t=10.787$ 、4.987、2.120、6.719、4.058,均 $P=0.000$)(表 1)。

2.2 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛素耐量的影响

方差分析 3 组幼鼠空腹血糖、注射胰岛素后 2 个时间点血糖水平及血糖曲线下面积,差异均有统计学意义($F=322.684$ 、362.094、197.142、135.995,均 $P=0.000$)。T1DM model

表 1 Met 对 T1DM 幼鼠腹腔注射葡萄糖耐量的影响

组别	葡萄糖/(mg·dL ⁻¹)				曲线下面积 /(mg·dL ⁻¹ ·h ⁻¹)
	0 min	30 min	60 min	120 min	
Control 组 (n=12)	116.2 \pm 10.5	193.1 \pm 20.8	154.3 \pm 16.4	130.7 \pm 13.4	583.2 \pm 60.6
T1DM model 组 (n=24)	315.4 \pm 30.8 ^a	482.6 \pm 47.3 ^a	328.7 \pm 31.5 ^a	276.9 \pm 26.1 ^a	719.8 \pm 73.7 ^a
T1DM+Met 组 (n=24)	232.7 \pm 21.6 ^{ab}	419.5 \pm 40.1 ^{ab}	309.9 \pm 30.2 ^{ab}	227.5 \pm 24.8 ^{ab}	635.4 \pm 70.2 ^{ab}

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$;b:与 T1DM model 组比较, $P<0.05$

组相比 Control 组明显升高($t=26.307$ 、 21.226 、 17.423 、 14.258 , 均 $P=0.000$), T1DM+Met 组明显低于 T1DM model 组($t=18.161$ 、 19.600 、 12.371 、 11.231 , 均 $P=0.000$)。胰岛素耐量试验中 40 min 血糖下降百分数 Control 组约为 32.3%, T1DM model 组降低至 18.4%, 而 T1DM+Met 组升高至 25.7%(表 2)。

2.3 Met 对 T1DM 幼鼠糖刺激胰岛素分泌功能的影响

相比于 T1DM model 组, T1DM+Met 组幼鼠的 FBG、FINS 水平均降低, 钳夹稳态时 GIR 值升高, 独立 t 检验分析差异均有统计学意义($t=15.669$ 、 25.858 、 20.889 , 均 $P=0.000$)(表 3)。在静脉输注葡萄糖的第一时相, T1DM model 组幼鼠胰岛素分泌明显缺失(0~10 min)(图 1A), 给予 Met 后, T1DM+Met 组胰岛素分泌明显增强, 葡萄糖刺激后的 1~15 min 均高于 T1DM model 组, 独立 t 检验分析差异有统计学意义($t=37.228$ 、 33.797 、 8.836 、 40.643 , 均 $P=0.000$); 葡萄糖钳夹实验过程中(60~180 min), T1DM+Met 组最大胰岛素分泌量均高于 T1DM model 组, 独立 t 检验分析差异有统计学意义($t=52.990$ 、 64.960 、 72.650 、 61.443 , 均 $P=0.000$)(图 1B)。

2.4 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺组织病理形态的影响

HE 染色结果显示, Control 组胰岛外周规则, 边界清晰,

T1DM model 组幼鼠胰岛边缘形态不规则, 出现血肿、脂肪空泡(图中蓝色箭头所指)及炎性浸润; T1DM+Met 组胰岛形态规则化, 胰岛中血肿、囊肿明显减少, 脂肪空泡缩小(图 2)。

2.5 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞增殖的影响

采用胰岛素和 Ki67 对胰岛 β 细胞进行免疫荧光共染, 以双阳性细胞数来反映细胞增殖情况。Control 组、T1DM model 组及 T1DM+Met 组细胞增殖率分别为 $(21.3 \pm 2.5)\%$ 、 $(6.8 \pm 1.2)\%$ 、 $(17.9 \pm 1.9)\%$, 方差分析 3 组差异有统计学意义($F=135.995$, $P=0.000$)。与 Control 组相比, T1DM model 组双染细胞数明显降低($t=18.844$, $P=0.000$), T1DM+Met 组明显高于 T1DM model 组, 差异具有统计学意义($t=24.265$, $P=0.000$)(图 3)。

2.6 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响

采用胰岛素和 TUNEL 试剂盒对胰岛 β 细胞进行免疫荧光共染, 以双阳性细胞数来反映细胞凋亡情况。Control 组、T1DM model 组及 T1DM+Met 组细胞凋亡率分别为 $(13.5 \pm 3.3)\%$ 、 $(60.9 \pm 9.7)\%$ 、 $(35.5 \pm 6.2)\%$, 方差分析 3 组差异有统计学意义($F=173.959$, $P=0.000$)。Control 组胰岛体积较大, 而 TUNEL 荧光染色的胰岛 β 细胞较少, T1DM model 组共染细

表 2 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛素耐量的影响

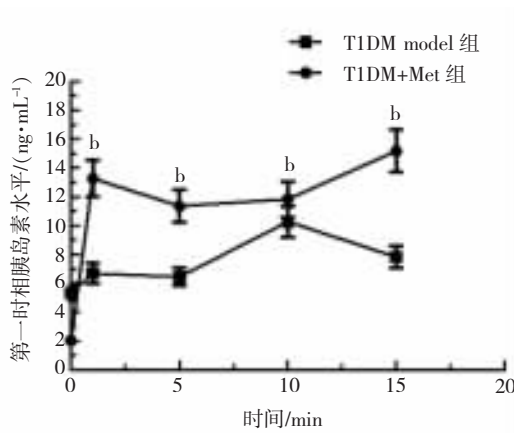
组别	葡萄糖/(mg·dL ⁻¹)			40 min 血糖下降百分数/%	曲线下面积/(mg·dL ⁻¹ ·h ⁻¹)
	0 min	40 min	90 min		
Control 组 ($n=12$)	126.4 ± 11.5	91.6 ± 8.95	112.9 ± 11.6	32.3	229.4 ± 23.7
T1DM model 组 ($n=24$)	308.6 ± 29.7 ^a	243.8 ± 23.9 ^a	235.3 ± 22.8 ^a	18.4 ^a	406.7 ± 39.5 ^a
T1DM+Met 组 ($n=24$)	179.3 ± 18.2 ^{ab}	132.1 ± 14.5 ^{ab}	165.4 ± 15.7 ^{ab}	25.7 ^{ab}	294.6 ± 28.8 ^{ab}

注: a, 与 Control 组比较, $P<0.05$; b, 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$

表 3 Met 对 T1DM 幼鼠 FBG、FINS、GIR 值的影响

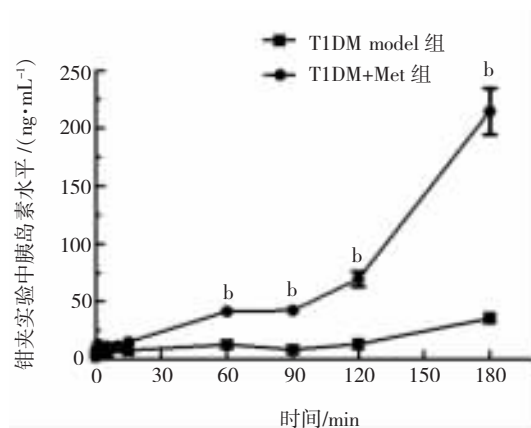
组别	FBG/(mg·dL ⁻¹)	FINS/(ng·mL ⁻¹)	GIR/(mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)
T1DM model 组 ($n=24$)	158.4 ± 13.9	6.1 ± 0.7	9.7 ± 0.8
T1DM+Met 组 ($n=24$)	102.6 ± 10.5 ^b	2.2 ± 0.2 ^b	18.4 ± 1.9 ^b

注: a, 与 Control 组比较, $P<0.05$; b, 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$



A. 第一时相血清胰岛素水平

注: b, 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$



B. 整个葡萄糖钳夹实验过程中血清胰岛素水平

图 1 二甲双胍对高葡萄糖钳刺激 T1DM 幼鼠胰岛素分泌的影响

胞数明显增加($t=21.617, P=0.000$), T1DM+Met 组胰岛体积增大, TUNEL 荧光染色的胰岛 β 细胞数明显回降, 差异有统计学意义($t=10.845, P=0.000$) (图 4)。

2.7 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺中 PDX-1 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Control 组、T1DM model 组及 T1DM+Met 组 PDX-1 相对表达量分别为 0.48 ± 0.10 、 0.21 ± 0.05 、 1.22 ± 0.23 , 方差分析

3 组差异有统计学意义($F=263.473, P=0.000$); Bcl-2 相对表达量分别为 0.54 ± 0.12 、 0.28 ± 0.07 、 1.10 ± 0.18 , 方差分析 3 组差异有统计学意义($F=226.747, P=0.000$)。相比 Control 组, T1DM model 组中 2 种蛋白表达水平均明显降低($t=8.997$ 、 6.894 , 均 $P=0.000$), T1DM+Met 组 PDX-1 和 Bcl-2 蛋白水平均升高, 差异有统计学意义($t=20.964$ 、 20.493 , 均 $P=0.000$) (图 5)。

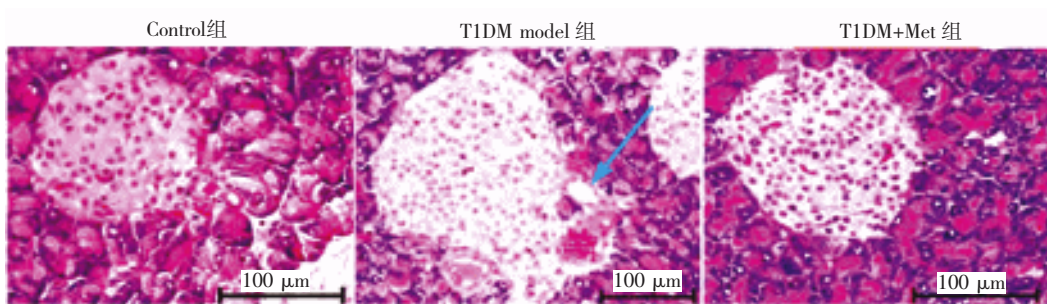
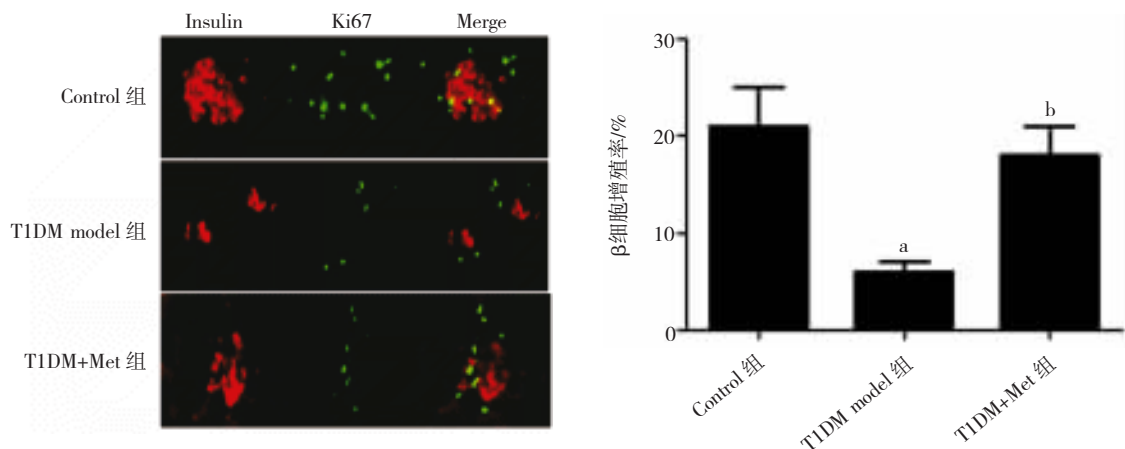
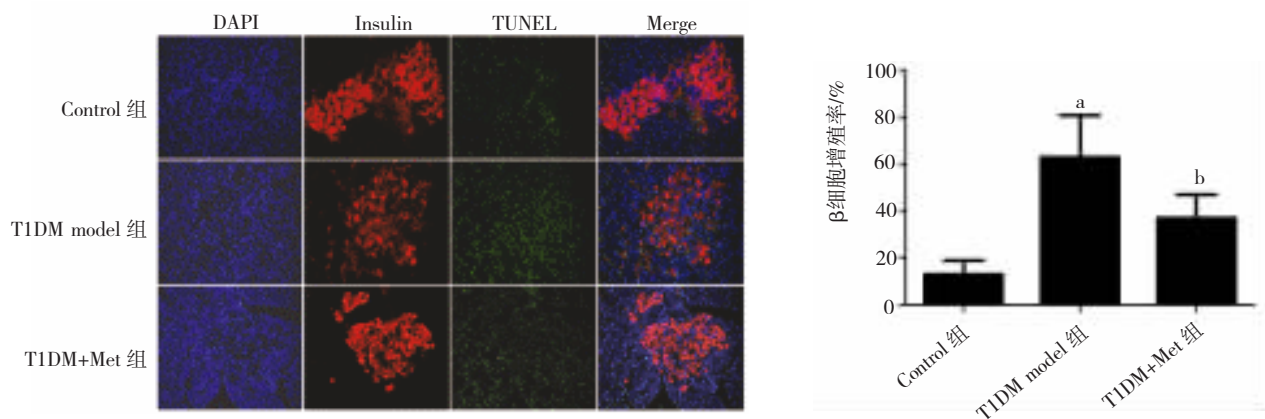


图 2 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺组织病理形态的影响



注:a, 与 Control 组比较, $P<0.05$; b: 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$

图 3 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞增殖的影响



注:a, 与 Control 组比较, $P<0.05$; b: 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$

图 4 Met 对 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响

2.8 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺内质网应激相关因子蛋白表达水平的影响

Control 组、T1DM model 组及 T1DM+Met 组磷酸化 eIF2 α 相对表达量分别为 0.48 ± 0.10 、 1.14 ± 0.18 、 1.01 ± 0.14 ，方差分析 3 组差异有统计学意义 ($F=81.322$, $P=0.000$)；ATF4 相对表达量分别为 0.76 ± 0.12 、 1.32 ± 0.24 、 0.34 ± 0.05 ，方差分析 3 组差异有统计学意义 ($F=215.372$, $P=0.000$)；CHOP 相对表达量分别为 0.56 ± 0.08 、 1.01 ± 0.13 、 0.87 ± 0.12 ，方差分析 3 组差异有统计学意义 ($F=55.059$, $P=0.000$)。与 Control 组相比，

T1DM model 组均显著升高 ($t=14.608$ 、 9.398 、 12.653 ，均 $P=0.000$)，T1DM+Met 组均回降，差异有统计学意义 ($t=2.695$ 、 19.617 、 3.836 ， $P=0.010$ 、 0.000 、 0.000) (图6)。

2.9 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺炎症相关因子 mRNA 表达水平的影响

Control 组、T1DM model 组及 T1DM+Met 组 NF- κ B mRNA 相对表达量分别为 1.08 ± 0.10 、 2.60 ± 0.18 、 1.21 ± 0.17 ，方差分析 3 组差异有统计学意义 ($F=570.275$, $P=0.000$)；IL-6 mRNA 相对表达量分别为 0.99 ± 0.10 、 2.61 ± 0.23 、 1.49 ± 0.17 ，方差分

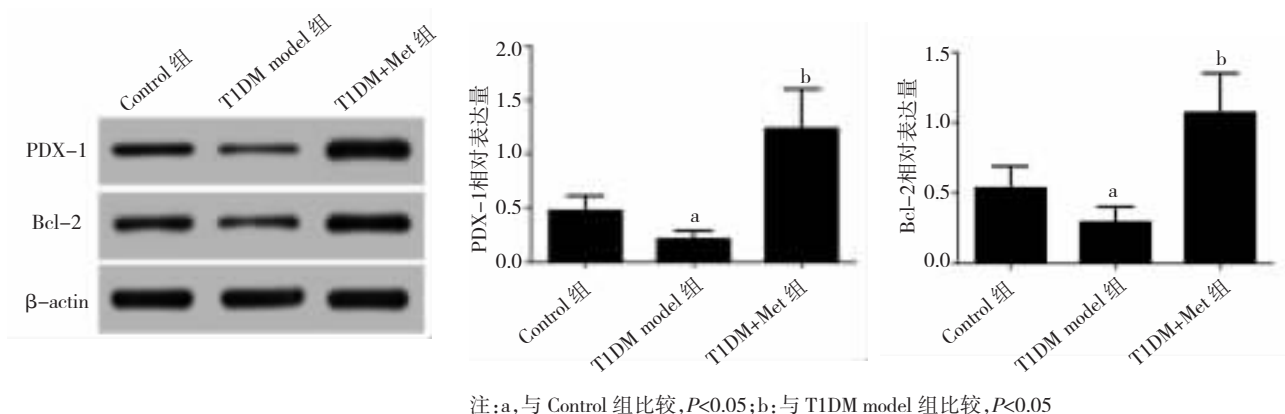


图5 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺中 PDX-1 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

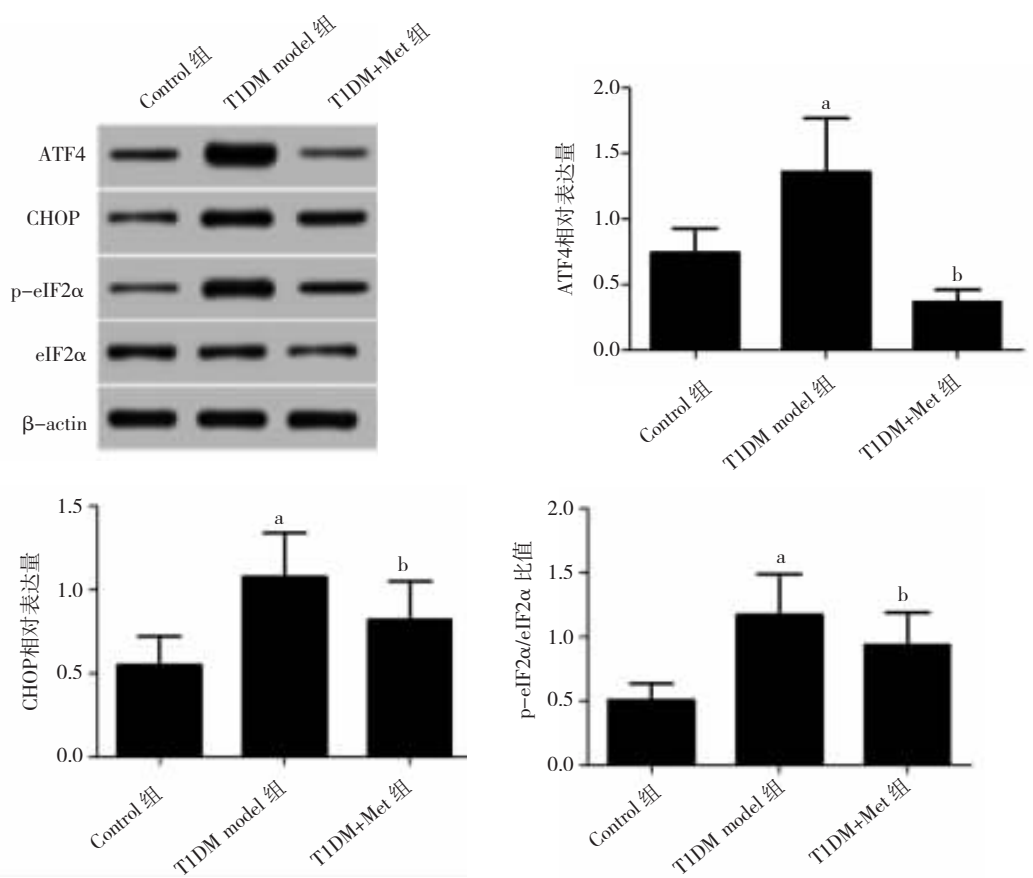
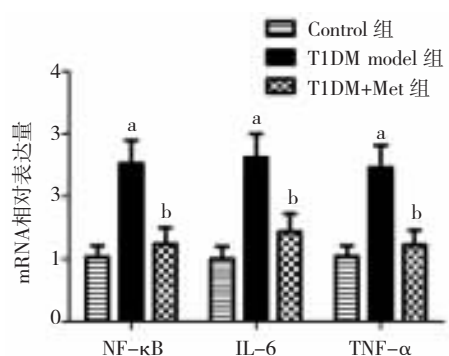


图6 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺内质网应激相关因子蛋白表达水平的影响

析 3 组差异有统计学意义 ($F=369.184, P=0.000$); TNF- α mRNA 相对表达量分别为 1.03 ± 0.10 、 2.51 ± 0.22 、 1.16 ± 0.14 , 方差分析 3 组差异有统计学意义 ($F=474.006, P=0.000$)。与 Control 组相比, T1DM model 组幼鼠胰腺中炎症相关因子 NF- κ B、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平均升高, 差异有统计学意义 ($t=33.250$ 、 29.149 、 27.533 , 均 $P=0.000$), T1DM + Met 组明显低于 T1DM model 组 ($t=27.782$ 、 19.219 、 25.255 , 均 $P=0.000$) (图 7)。



注: a, 与 Control 组比较, $P<0.05$; b, 与 T1DM model 组比较, $P<0.05$

图 7 Met 对 T1DM 幼鼠胰腺炎症相关因子 mRNA 表达水平的影响

3 讨论

目前, 胰岛素替代治疗仍是 T1DM 的主要治疗方法。随着患者病程延长, 胰岛素抵抗大大加重, 糖尿病微血管、大血管等并发症的风险也随之增加。作为治疗 T2DM 的一线口服药物, Met 很少引起低血糖及体重增加, 且多次被报道对癌症、心血管疾病、多囊卵巢综合征及非酒精性脂肪肝等有益处, 因此近年来逐渐用于 T1DM 的治疗^[7-8]。早期多项研究表明, Met 可使 T2DM 小鼠的胰岛 β 细胞功能明显改善, 胰岛素分泌功能恢复^[9]。本研究采用链脲佐菌素诱导 T1DM 幼鼠模型, 并给予 Met 治疗。葡萄糖耐量实验、胰岛素耐量实验及高葡萄糖钳夹实验结果表明, Met 可使 T1DM C57B/L6 幼鼠胰岛 β 细胞对葡萄糖的敏感性增加, 反应性增强, 对葡萄糖刺激的胰岛素分泌发挥促进作用, 胰岛 β 细胞功能得到明显改善。胰腺 HE 染色结果提示, Met 可使 T1DM C57B/L6 幼鼠的胰岛形态得到一定程度的恢复。

以往文献多关于 Met 对 T2DM 胰岛 β 细胞作用机制的研究报道, 且大量文献显示 Met 可能是通

过促进胰腺增殖、降低炎症反应、改善脂质代谢及缓解质网应激状态等, 进而改善胰岛 β 细胞功能, 恢复胰岛素分泌^[10]。然而, 关于 Met 对 T1DM 胰岛 β 细胞的作用机制报道较为少见, 因此本研究将进一步研究其可能的作用机制。核蛋白 Ki67 与核糖体 RNA 转录相关, 常被用作细胞增殖的标志^[11]。本研究采用胰岛素和 Ki67 进行免疫荧光共染, 以双阳性细胞数占总 β 细胞的比例来反映细胞增殖率, 结果提示 Met 能够促进胰岛 β 细胞的增殖。进一步采用胰岛素和 TUNEL 试剂盒进行免疫荧光共染, 以双阳性细胞数占总 β 细胞的比例来反映细胞凋亡情况, 结果提示 Met 能够抑制胰岛 β 细胞的凋亡。胰岛素启动因子 PDX-1 是重要的调节因子, 不仅参与胰岛 β 细胞的分化, 还能促进 β 细胞成熟及胰腺生长发育。有研究证实, 大量凋亡的细胞中, PDX-1 蛋白和基因水平均明显降低^[12]。作为 B 细胞淋巴瘤家族中的成员, Bcl-2 早已被证实具有明确的抗凋亡作用^[13]。为探讨 Met 是否通过调节 PDX-1 和 Bcl-2 的表达而促进胰岛 β 细胞增殖, 本研究采用 Western blot 检测 2 种蛋白, 结果表明 Met 能促进残存 β 细胞的增殖、胰腺干细胞向 β 细胞转化及启动抗凋亡机制, 进而促进胰腺增殖。

PERK、IRE1 α 和 ATF6 信号通路可在内质网应激作用下被激活, 短期的内质网应激对胞内错误折叠蛋白堆积造成的压力可起到缓解作用, 而内质网应激状态时间过长则能诱导细胞凋亡。eIF2 α 在 PERK 形成二聚体后会发生磷酸化, 进而使 eIF2/GTP/Met-tRNA_i 翻译起始复合物的形成受阻, 从而导致蛋白质的合成被抑制, 内质网腔内堆积的蛋白质随之减少, 下游的 ATF4 可在 eIF2 α 长期活化下被激活, 导致 CHOP 诱导的凋亡启动^[14]。本研究经 Western blot 检测 PERK 信号通路中相关蛋白的表达情况, 结果提示 T1DM 幼鼠胰岛 β 细胞凋亡可能与内质网应激激活的 PERK 通路有关, 而 Met 则能通过下调 PERK 信号通路及其下游蛋白 eIF2 α -ATF4-CHOP 进而使 C57B/L6 幼鼠胰岛 β 细胞功能得到改善。

通常情况下, 被激活的 TLR4 可使下游转录因子 NF- κ B 激酶被激活, 活化后的 NF- κ B 则对下游相关靶基因 TNF- α 、IL 等促炎症因子发挥调控作用, 进而引发活性氧物质、脂质、一氧化氮及细胞黏附分

子等中间介质的释放,最终诱导组织发生慢性炎症和细胞损伤^[15]。陈致瑜等^[16]早期研究发现,Met 可一定程度下调 T2DM KKAy 小鼠胰腺中 NF- κ B 炎症信号通路及其上下游因子的 mRNA 表达水平。本研究通过 RT-qPCR 检测胰腺组织中炎症相关因子,结果发现在 T1DM 幼鼠模型中,Met 能下调 NF- κ B、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平。这与上述 T2DM 的研究报道一致,提示 Met 可通过改善胰腺组织的炎症状态进而改善胰岛 β 细胞功能。

综上所述,Met 可改善 T1DM C57B/L6 幼鼠胰岛 β 细胞对葡萄糖刺激的胰岛素分泌,增加胰岛素分泌能力,恢复胰岛形态,促进 β 细胞增殖而抑制其凋亡。其作用机制可能是通过促分化、抗凋亡、缓解内质网应激压力及炎症状态来实现。然而,关于 Met 对 PDX-1 和 Bcl-2、内质网应激通路及炎症通路是直接作用还是间接作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Osaki A, Shimoda Y, Okada J, et al. Lower renal threshold for glucose reabsorption in type 1 diabetes mellitus (T1DM) may explain the smaller contribution of SGLT2 inhibitors to the improvement of plasma glucose control compared with T2DM[J]. Diabetes Ther, 2019, 10(4): 1531–1534.
- [2] Wolf P, Fellingner P, Pflieger L, et al. Reduced hepatocellular lipid accumulation and energy metabolism in patients with long standing type 1 diabetes mellitus[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 2576.
- [3] Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure[J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16(7): 349–362.
- [4] Smith MJ, Simmons KM, Cambier JC. B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(11): 712–720.
- [5] Shi Q, Liu SQ, Fonseca VA, et al. Effect of metformin on neurodegenerative disease among elderly adult US veterans with type 2 diabetes mellitus[J]. BMJ Open, 2019, 9(7): e024954.
- [6] Ono K, Wada H, Satoh-Asahara N, et al. Effects of metformin on left ventricular size and function in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: results of a randomized, controlled, multicenter, phase IV trial[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2020, 20(3): 283–293.
- [7] Cheung KS, Chan EW, Wong AYS, et al. Metformin use and gastric cancer risk in diabetic patients after *Helicobacter pylori* eradication[J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(5): 484–489.
- [8] Tseng CH. Metformin and risk of hepatocellular carcinoma in patients with type 2 diabetes[J]. Liver Int, 2018, 38(11): 2018–2027.
- [9] Tomášová P, Bugáňová M, Pelantová H, et al. Metabolomics based on MS in mice with diet-induced obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of vildagliptin, metformin, and their combination[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 188(1): 165–184.
- [10] Sudhakara G, Mallaiah P, Rajendran R, et al. Caralluma fimbriata and metformin protection of rat pancreas from high fat diet induced oxidative stress[J]. Biotech Histochem, 2018, 93(3): 177–187.
- [11] Lanng MB, Møller CB, Andersen AH, et al. Quality assessment of Ki67 staining using cell line proliferation index and stain intensity features[J]. Cytometry A, 2019, 95(4): 381–388.
- [12] Sandikei M, Karagenc L, Yildiz M. Changes on the pancreas in experimental diabetes and the effect of lycopene on these changes: pdx-1, ngn-3, and nestin expressions[J]. Anat Rec (Hoboken), 2017, 300(12): 2200–2207.
- [13] Cournoyer S, Addiou A, Belounis A, et al. GX15-070 (Obatoclox), a Bcl-2 family proteins inhibitor engenders apoptosis and pro-survival autophagy and increases chemosensitivity in neuroblastoma[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1018.
- [14] Lebeau J, Saunders JM, Moraes VWR, et al. The PERK arm of the unfolded protein response regulates mitochondrial morphology during acute endoplasmic Reticulum stress[J]. Cell Rep, 2018, 22(11): 2827–2836.
- [15] Xu XL, Lin SD, Chen YS, et al. The effect of metformin on the expression of GPR109A, NF- κ B and IL-1 β in peripheral blood leukocytes from patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Clin Lab Sci, 2017, 47(5): 556–562.
- [16] 陈致瑜, 刘率男, 罗振华, 等. 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[J]. 药学报, 2017, 52(10): 1561–1567.

(责任编辑:唐秋姗)