

脂糖代谢疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001747

二甲双胍对妊娠期糖尿病小鼠模型糖代谢
及胰岛功能的远期作用

赵亚兰, 张 华

(重庆医科大学附属第一医院产科、重庆医科大学中国-加拿大-新西兰母胎医学实验室, 重庆 400061)

【摘要】目的:探讨妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)小鼠模型老年期糖代谢特点及孕期二甲双胍治疗对 GDM 小鼠胰岛素抵抗和胰岛功能的远期影响。**方法:**将小鼠随机分成对照组($n=6$)、GDM 组($n=6$)、治疗组($n=6$),采用高脂饮食诱导建立 GDM 动物模型,治疗组于孕 11.5~17.5 d 给予二甲双胍治疗。分娩后均转维持饲料,并定期监测其体质量变化。并于分娩 9 个月后,应用口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)及胰岛素耐量试验(insulin tolerance test, ITT)检测糖代谢。利用 HE 染色法观察胰岛的病理学改变。通过免疫组化染色法检测 Ki67 蛋白在胰腺组织中的表达。**结果:**分娩 2 个月后,与对照组相比, GDM 及治疗组小鼠体质量增长明显($F=3.875, P=0.044$)。与对照组相比, GDM 组腹腔注射胰岛素后血糖下降缓慢($P=0.004$)。GDM 组胰岛萎缩,数目减少。Ki67 在对照组胰岛中呈强阳性表达($P=0.032$)。**结论:**GDM 小鼠模型分娩后,葡萄糖的调节能力可以基本恢复正常,但是胰岛素抵抗持续存在。进入老年后,胰岛组织萎缩,功能逐渐减退,增殖能力降低。而孕期给予二甲双胍治疗可以增强其老年期的胰岛素敏感性,改善胰岛的病理学改变,但不能改变胰岛组织的增殖能力。

【关键词】妊娠期糖尿病;二甲双胍;胰岛素抵抗**【中图分类号】**R714.25**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-18Long-term effect of metformin on the glucose metabolism and islet function
in mice with gestational diabetes mellitus

Zhao Yalan, Zhang Hua

(Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Canada-China-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the characteristics of glucose metabolism and the effect of metformin treatment on the insulin resistance and islet function in elderly mice with the history of gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods:** The mice were randomly divided into the control group ($n=6$), GDM group ($n=6$) and treatment group ($n=6$). The animal model was established by high fat diet and the treatment group was administered metformin in the 11.5–17.5d of pregnancy. The body weight was monitored every month after delivery. Nine months after delivery, oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were adopted to detect the glucose metabolism in elderly mice with GDM history. The pathological changes of islets were observed under HE staining, and the expression of Ki67 in pancreatic tissues was detected by immunohistochemical staining. **Results:** Two months after delivery, the body weights of GDM and treatment group increased significantly ($F=3.875, P=0.044$) compared with the control. In GDM group, Glucose decreased slowly after intraperitoneal injection of insulin ($P=0.004$), islet shrank and the number of islets decreased. The expression of Ki67 was strongly positive in the islets of the control group ($P=0.032$). **Conclusion:** For mice with GDM, blood glucose can return to be normal after delivery, but insulin resistance persists. For the elderly mice with GDM history, the islets present atrophy, function degenerates gradually, and the proliferation ability decreases. Metformin treatment during pregnancy can reverse the elderly insulin resistance and improve the pathological changes of islets, but can not change the proliferation ability.

作者介绍:赵亚兰, Email: yalanzhao922@foxmail.com,

研究方向: 围产医学。

通信作者:张 华, Email: zh2844@gmail.com。**基金项目:**国家自然科学基金面上资助项目(编号:81571453, 81771607)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.001747.html>

(2018-05-25)

【Key words】gestational diabetes mellitus; metformin; insulin resistance

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是指妊娠期首次发生或者发现的不同程度的糖代谢水平异常, 是一种多基因遗传的代谢性疾病。近年来, GDM 发病率不断升高, 严重危害母婴健康, 增加妊娠期高血压疾病、早产、巨大儿、新生儿呼吸窘迫综合征等疾病的发病率^[1-3], 同时还会对母亲及其子代产生远期危害。有研究发现, 患有 GDM 的母亲, 产后发生 2 型糖尿病^[4]、心血管疾病^[5]、代谢综合征^[6]的风险也明显增加。因此, 孕期控制血糖同时改善糖代谢是减少不良结局的关键。二甲双胍 (metformin) 是常用的口服降糖药物^[7-8]。但因其可通过胎盘屏障, 故在 GDM 中应用的安全性一直存在争议。本研究旨在探讨 GDM 小鼠模型老年期糖代谢特点及孕期二甲双胍治疗对其胰岛素抵抗和胰岛功能的远期影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 6~8 周健康雌性 C57 小鼠 40 只, 6~8 周健康雄性 C57 小鼠 20 只, 本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。动物饲料: 高脂饲料 (Research Diets D12451), 含 45% 脂肪, 20% 蛋白质, 35% 碳水化合物; 低脂饲料 (Research Diets AIN-93G), 含 15.8% 脂肪, 20.3% 蛋白质, 63.9% 碳水化合物。主要试剂: 二甲双胍及葡萄糖 (美国 Sigma 公司), 胰岛素注射液 (江苏万邦), Ki67 抗体 (Protein-tech)。主要仪器: 血糖仪及试纸 (美国强生)。

1.2 GDM 动物模型的建立

健康成年的雌鼠随机分为 2 组, 模型组 ($n=8$) 和正常组 ($n=8$)。模型组高脂饲料喂养 1 周后与雄鼠按 2:1 比例合笼, 次日清晨检查阴栓, 若检测到阴栓则标记为妊娠 0.5 d, 整个孕期持续高脂饮食。正常组孕前 1 周及孕期给予低脂饲料, 其余同模型组。于孕 16.5 d 行葡萄糖耐量试验, 若模型组糖代谢明显异常, 则造模成功。

1.3 实验分组

所有实验小鼠普通饮食适应性喂养 2 周, 随机分为 3 组: 对照组 ($n=6$)、GDM 组 ($n=6$)、治疗组 ($n=6$)。GDM 及治疗组孕前 1 周及孕期给予高脂饮食喂养, 对照组孕前 1 周及孕期给予低脂饮食喂养。于孕 11.5~17.5 d, 治疗组给予 300 mg/(kg·d) 二甲双胍溶液灌胃, GDM 及对照组则给予相同剂量的 PBS 灌胃。2 组孕鼠分娩后均给予普通维持饲料, 喂养至 12 月龄。

1.4 检测指标

1.4.1 OGTT 和 ITT 检测小鼠 12 月龄时的口服葡萄糖耐

量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 水平。首先将小鼠禁食 6 h, 按禁食后的体质量, 以 2 g/kg 的量经口腔灌注 20% 的葡萄糖溶液, 由尾静脉采血, 用血糖仪检测灌注前、灌注后 30、60、90、120 min 的血糖水平, 绘制 OGTT 曲线并计算曲线下面积 (AUC)。检测小鼠 12 月龄时的胰岛素耐量试验 (insulin tolerance test, ITT) 水平。首先将小鼠禁食 6 h, 按禁食后的体质量, 以 2.5 U/kg 的量经腹腔注射 0.25 U/mL 的胰岛素溶液, 由尾静脉采血, 用血糖仪检测注射前、注射后 15、30、60、120 min 的血糖水平, 绘制 ITT 曲线并计算 AUC。

1.4.2 胰腺组织 HE 染色 所有 12 月龄的小鼠禁食 6 h 后, 戊巴比妥钠溶液腹腔麻醉后, 快速分离胰腺组织。4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色后于光镜下观察胰腺组织的形态学变化。

1.4.3 免疫组化法检测胰腺组织 Ki67 蛋白的表达 胰腺组织 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 免疫组化法检测 Ki67 的表达。脱蜡; 微波修复法抗原修复, PBS 冲洗, 5 min × 1 次; 3% 过氧化氢溶液孵育 10 min, PBS 冲洗, 3 min × 3 次; 非免疫山羊血清室温封闭 30 min; 滴加一抗, 4 °C 过夜, PBS 冲洗, 10 min × 3 次; 滴加二抗, 室温孵育 1 h, PBS 冲洗, 10 min × 3 次; DAB 显色; 苏木精复染; 脱水封片。显微镜下采集图片, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算平均光密度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。采用独立样本 t 检验进行 2 组间比较; 采用单因素方差分析进行多组间比较, 组间两两比较采用 LSD- t 法; 模型建立中的 OGTT 结果先进行重复测量方差分析, 后应用独立样本 t 检验分析同一时间点 2 组间的血糖差异及曲线下面积差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 高脂饮食诱导妊娠期糖尿病小鼠模型建立

为了评价建模效果, 对妊娠期 16.5 d 的 OGTT 结果进行了重复测量方差分析, 结果显示分组主效应 ($F=107.379, P=0.000$), 时间主效应 ($F=1187.974, P=0.000$) 及两者交互效应 ($F=40.621, P=0.000$) 均具有统计学差异。说明血糖值有随时间因素变化的趋势, 且时间对血糖的影响会随着分组的不同而变化。接下来对同一时间点不同分组间的血糖值进行了比较 (表 1)。与正常组相比, 模型组空腹血糖偏高 ($t=2.485, P=0.026$); 给予葡萄糖灌胃后, 模型组血糖下降缓慢, 与正常组相比, 其灌注后 30 min ($t=18.756, P=0.000$)、60 min ($t=7.766, P=0.000$)、90 min ($t=3.452, P=0.004$) 的血糖水平明显升高; 通过 AUC 分析也发现, 模型组较正常组有升高的趋势 ($t=10.926, P=0.000$)。综上所述, 模型组 OGTT 结果明显异常, 调节葡萄糖的能力下降, 高脂饮食诱导妊娠期糖尿病小鼠模型建模成功。

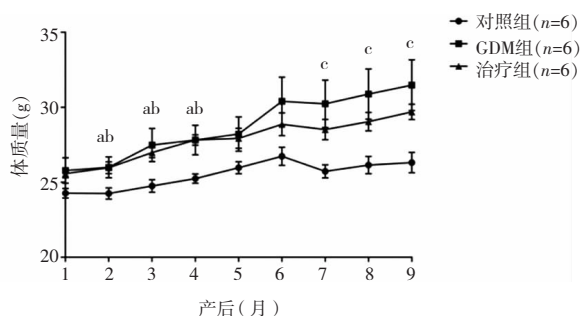
表 1 模型组和正常组 OGTT 结果比较

组别	OGTT 血糖值 (mmol/L)					AUC
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
模型组 (n=8)	5.4 ± 0.5 ^a	16.5 ± 0.4 ^b	12.9 ± 0.9 ^b	8.3 ± 0.6 ^b	5.4 ± 0.4	23 270.6 ± 882.5
正常组 (n=8)	4.9 ± 0.5	12.9 ± 0.3	9.9 ± 0.6	7.2 ± 0.6	5.2 ± 0.3	18 896.6 ± 709.4
t 值	2.485	18.756	7.766	3.452	1.321	10.926
P 值	0.026	0.000	0.000	0.004	0.208	0.000

注:a,模型组与正常组相比, $P<0.05$;b;模型组与正常组相比, $P<0.01$

2.2 分娩后小鼠体质量增长趋势

3 组小鼠分娩后均转普通饲料喂养。在分娩 2 个月后,3 组小鼠体质量具有明显统计学差异($F=3.875, P=0.044$)。与对照组相比,GDM 组($P=0.028$)及治疗组($P=0.031$)的小鼠体质量持续升高。分娩 5 个月后,虽然治疗组的体质量增长速度较 GDM 组有所减慢,但 2 组间仍无明显统计学差异($P=0.097$)。见图 1。



a: GDM 组与对照组比较, $P<0.05$;b: 治疗组与对照组比较, $P<0.05$;c: GDM 组与对照组比较, $P<0.01$

图 1 分娩后 9 个月间小鼠体质量增长曲线

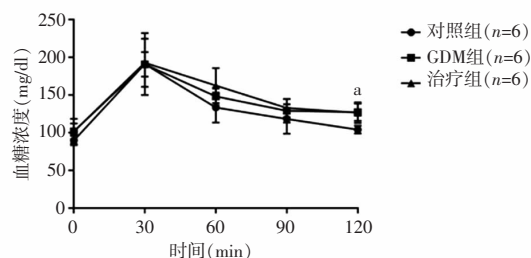
2.3 GDM 小鼠分娩后对葡萄糖的调节能力基本恢复正常但出现胰岛素抵抗

OGTT 结果及曲线下面积(AUC)分析显示,葡萄糖灌注前,3 组小鼠血糖值无明显统计学差异($F=2.009, P=0.169$),灌注后 2 h GDM 组较对照组血糖值高($P=0.002$),但 3 组的 AUC 并无明显统计学差异($F=1.624, P=0.230$)。说明与对照组相比,GDM 组调节葡萄糖的能力无明显差异(图 2A、B)。ITT 结果及 AUC 分析显示,与对照组相比,GDM 组腹腔注射胰岛素后 30 min($P=0.000$)、60 min($P=0.008$)血糖下降缓慢,其 AUC 明显升高($P=0.004$),说明 GDM 组老年小鼠存在明显胰岛素抵抗。与 GDM 组相比,治疗组小鼠注射胰岛素后 30 min($P=0.009$)、60 min($P=0.026$)血糖降低较快,AUC 有降低的趋势,说明孕期二甲双胍治疗存在提高胰岛素敏感性的作用(图 2C、D)。

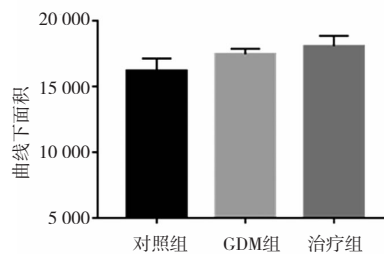
2.4 进入老年期,GDM 小鼠胰岛出现病理学改变,孕期二甲双胍治疗可以改善

3 组小鼠的胰腺组织经 HE 染色后光镜下观察。对照组小鼠胰岛数量较多,面积大小不等,形态规则边界清楚。GDM 组小鼠胰岛数量明显减少,胰岛面积萎缩,形态不一。治疗组

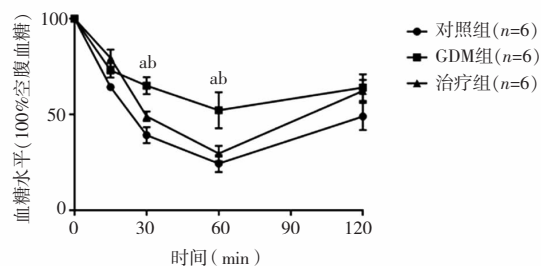
小鼠胰岛数量较高脂组增多,胰岛面积与正常组类似,形态较规则,边界欠清(图 3)。



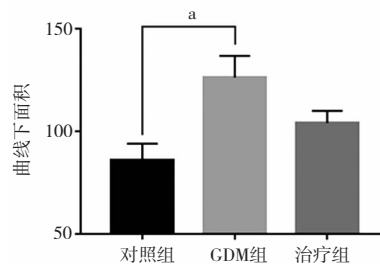
A. OGTT 曲线图



B. OGTT 曲线下面积比较



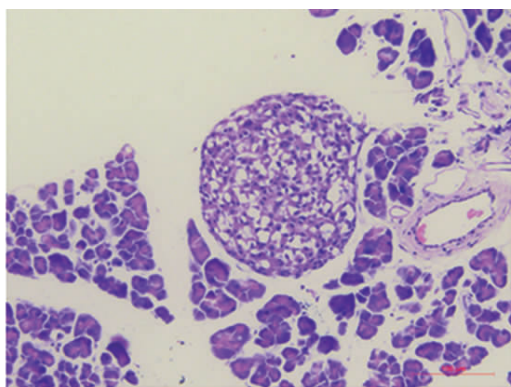
C. ITT 曲线图



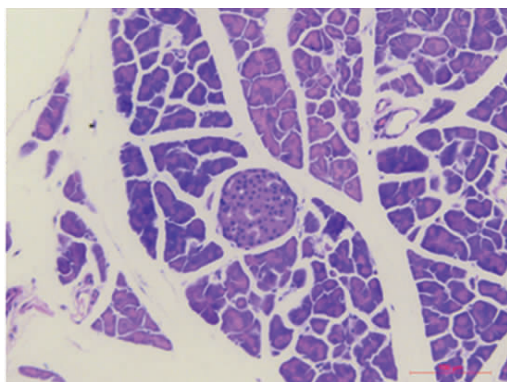
D. ITT 曲线下面积比较

a: GDM 组与对照组比较, $P<0.01$;b: 治疗组与 GDM 组比较, $P<0.05$

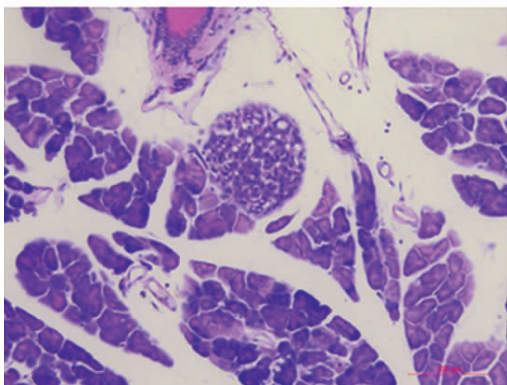
图 2 12 月龄小鼠的葡萄糖耐量试验及胰岛素耐量试验



A. 对照组



B. GDM 组

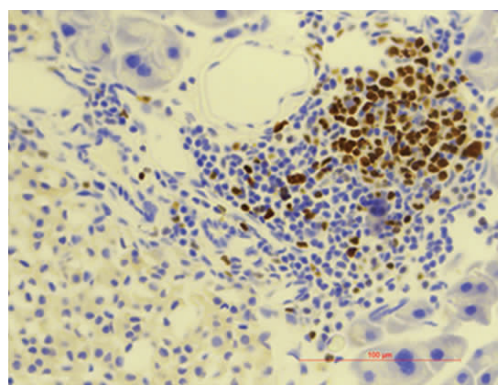


C. 治疗组

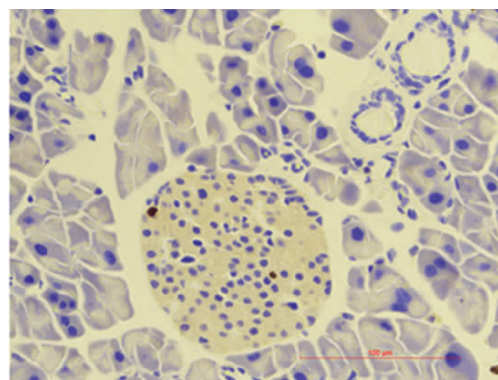
图 3 胰腺组织 HE 染色的结果 (200 ×)

2.5 Ki67 在胰腺组织的表达

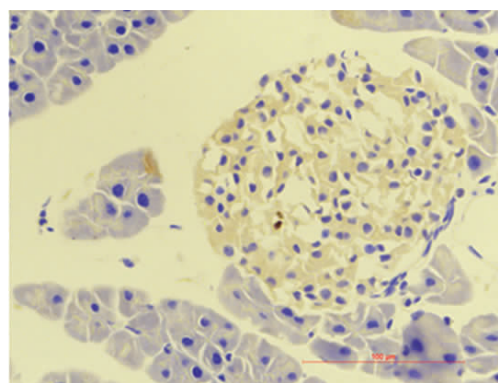
通过免疫组化染色,可以看到细胞增殖标记物 Ki67 主要定位于胰岛的细胞核(图 4)。对照组胰岛部着色较深,而 GDM 组及治疗组染色较浅,其平均光密度分别为对照组 0.149 ± 0.109 、GDM 组 0.006 ± 0.003 、治疗组 0.016 ± 0.0030 。3 组之间比较虽然无明显统计学差异 ($F=4.791, P=0.057$),但两两比较发现,对照组较 GDM 组 ($P=0.032$) 和治疗组 ($P=0.042$) Ki67 的表达量升高。



A. 对照组



B. GDM 组



C. 治疗组

图 4 Ki67 在胰腺组织中的表达 (免疫组化染色, 400 ×)

3 讨论

GDM 是一种以代谢异常为主要表现的妊娠期并发症,其发病机制复杂,主要涉及 2 个关键环节,即胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞分泌相对不足。妊娠中后期生理性血容量增加,胰岛素浓度降低,同时孕期增加的雌孕激素及胎盘激素具有拮抗胰岛素的作用,外周组织对胰岛素的敏感性下降,胰岛素需求增大。如果此时胰岛 β 细胞分泌的胰岛素不能代

偿胰岛素抵抗的部分,糖代谢就会发生紊乱,进而发展为 GDM。

虽然大多数患有 GDM 的女性在产后血糖值可以恢复正常水平。但是大量的研究^[4-6,9]发现,这部分女性产后发生 2 型糖尿病、心血管疾病、代谢综合征的风险明显增加。说明虽然血糖值恢复了正常,但其体内的代谢紊乱并未完全消除。国内外的一部分临床研究^[10-12]发现,GDM 的产妇在分娩后依然表现出慢性胰岛素抵抗的状态。本研究也发现,GDM 组的小鼠在分娩后体质量增长迅速;进入老年期后,虽然葡萄糖耐量实验表现正常,但其胰岛已经发生了萎缩,数量减少等病理学改变,且胰岛素敏感性下降,出现胰岛素抵抗。1995 年 Stern^[13]提出的“共同土壤学说”认为胰岛素抵抗是糖尿病和心血管疾病的共同危险因素,同时,也有研究证明了代谢综合征、肥胖等代谢性疾病与胰岛素抵抗的相关性^[13-15]。因此,产后持续的胰岛素抵抗状态很可能是 GDM 远期危害的主要原因之一。

二甲双胍是常用的口服降糖药,其降血糖的机制主要包括^[7]减少肠道对葡萄糖的吸收、抑制肝脏的糖异生及提高外周组织对葡萄糖的敏感性。同时,二甲双胍不通过刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素来维持血糖,由此可较好地保护受损胰岛功能,因此被广泛应用于糖尿病的治疗。但由于二甲双胍可通过胎盘屏障^[6],故其应用于 GDM 治疗的安全性一直备受争议。目前一部分临床研究^[17-18]已证明妊娠期应用二甲双胍可有效控制血糖,减少不良妊娠结局。然而,二甲双胍对母婴的远期影响仍知之甚少。本研究发现,孕期应用二甲双胍治疗 GDM 可减缓产后体质量增长速度。进入老年期后,其对胰岛素敏感性有保护作用,且对胰岛的病理学改变也有改善。

综上所述,本研究通过高脂饮食建立了 GDM 的动物模型,旨在观察 GDM 小鼠模型老年期的糖代谢水平,胰岛的形态学改变以及孕期二甲双胍治疗对母体的远期疗效。通过本研究证实 GDM 组的小鼠在产后血糖水平虽然可以恢复正常,但其胰岛素抵抗的状态持续存在。同时,老年期 GDM 组小鼠更容易发生肥胖、胰岛萎缩、数量减少、增殖能力降低。孕期应用二甲双胍可以有效改善小鼠胰岛素抵抗的状态,减慢体质量增加及胰岛的病理学改变,但是并不能增强胰岛的增殖能力。在后续研究中,将进一步探究二甲双胍在改善 GDM 远期预后中的作用机制,为 GDM 远期并发症的防治及二甲双胍的应用提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Schneider S, Freerksen N, Røhrig S, et al. Gestational diabetes and preeclampsia—similar risk factor profiles? [J]. *Early Human Development*, 2012, 88(3):179–184.
- [2] Östlund I, Haglund B, Hanson U. Gestational diabetes and preeclampsia [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, 113(1):12–16.
- [3] Ke K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review [J]. *Ann Nutr Metab*, 2015, 66(S2):14–20.
- [4] Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2009, 373(9677):1733–1779.
- [5] Goueslard K, Cottenet J, Mariet AS, et al. Early cardiovascular events in women with a history of gestational diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15:15.
- [6] Edalat B, Sharifi F, Badamchizadeh Z, et al. Association of metabolic syndrome with inflammatory mediators in women with previous gestational diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2013, 12(1):8.
- [7] 母义明, 纪立农, 宁光, 等. 二甲双胍临床应用专家共识(2016 年版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(10):871–884.
- [8] Butalia S, Gutierrez L, Lodha A, et al. Short- and long-term outcomes of metformin compared with insulin alone in pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabet Med*, 2017, 34(1):27–36.
- [9] Burlina S, Dalfrè MG, Chillelli NC, et al. Gestational diabetes mellitus and future cardiovascular risk: an update [J]. *Int J Endocrinol*, 2016, 2016:2070926.
- [10] Pallardo LF, Herranz L, Martín-Vaquero P, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in women with prior gestational diabetes are associated with a different cardiovascular profile [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(8):2318–2322.
- [11] Kautzky-Willer A, Bancher-Todesca D, Birnbacher R. Gestational diabetes mellitus [J]. *Acta Med Austriaca*, 2004, 31(5):182–184.
- [12] 王蕴慧, 张留苗, 王振花, 等. 妊娠期糖尿病患者产后糖代谢异常转归及胰岛素抵抗恢复情况研究 [J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2012, 8(2):110–114.
- [13] Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The “common soil” hypothesis [J]. *Diabetes*, 1995, 44(4):369–374.
- [14] 李启富, 程庆丰. 胰岛素抵抗与代谢综合征 [J]. *心血管病学进展*, 2006, 27(6):685–687.
- [15] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, 89(6):2595–2600.
- [16] Charles B, Norris R, Xiao X, et al. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy [J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(1):67–72.
- [17] Rowan JA, Hague WM, Gao W, et al. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19):2003–2015.
- [18] Gandhi P, Bustani R, Madhuvrata P, et al. Introduction of metformin for gestational diabetes mellitus in clinical practice: has it had an impact? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 160(2):147–150.

(责任编辑:冉明会)