

GIP受体抑制剂对诱导的糖尿病小鼠糖脂代谢的研究*

党珊¹, 杨飞², 吕宏军², 吴友伟¹, 张健¹, 易默¹, 史丽萍¹, 施秉银²

(1. 陕西省人民医院消化内二科, 西安 710068;

2. 西安交通大学第一附属医院内分泌科, 西安 710061)

摘要:目的 研究糖依赖性胰岛素释放肽(GIP)受体抑制剂 pro3(GIP)对高脂饲料和链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的血糖、血脂、瘦素、脂联素以及脂肪组织炎症的影响。方法 27只小鼠随机分正常组和模型组,模型组喂食高脂饲料并注射链脲佐菌素,血糖 ≥ 16.9 mmol/L者共17只,为糖尿病模型组。将模型组分为糖尿病对照组和pro3(GIP)组,后者给予pro3(GIP)进行干预。每周追踪血糖,并进行糖耐量的测定。取小鼠血清测血脂、瘦素、脂联素,其脂肪组织进行HE染色,观察脂肪组织炎症的变化。结果 药物干预6周后,pro3(GIP)组的血糖较糖尿病组的血糖明显减低,差异有统计学显著性意义($t=8.43, P<0.01$),0,30,60和120 min的胰岛素水平也均明显低于糖尿病组($t=3.90, 2.60, 6.88$ 和 $3.33, P<0.05$)。病理HE染色观察,pro3(GIP)组脂肪组织的炎症浸润较糖尿病组明显减轻,此外pro3(GIP)组血清瘦素水平显著低于糖尿病组($t=5.04, P<0.01$),但两组的血清三酰甘油、胆固醇及脂联素水平均无明显差异($P>0.05$)。结论 pro3(GIP)能显著地降低糖尿病小鼠的血糖、胰岛素、瘦素水平,并减轻脂肪的炎症浸润,进而调节糖尿病小鼠的代谢水平。

关键词:糖依赖性胰岛素释放肽;pro3(GIP);链脲佐菌素;糖尿病小鼠;代谢

中图分类号:R-332 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)05-041-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.011

Study on Glycolipid Metablism of Mice with Diabetes Induced by Peptide Receptor Antagonist Pro3(GIP)

DANG Shan¹, YANG Fei², LÜ Hong-jun², WU You-wei¹, ZHANG Jian¹, YI Mo¹,

SHI Li-ping¹, SHI Bing-yin² (1. the Second Department of Gastroenterology,

Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Endocrinology,

the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the metabolic effects of glucose dependent insulinotropic peptide receptor antagonist pro3(GIP) in induced diabetes mice about blood glucose, triglyceride, cholesterol, leptin and fatty issue. **Methods** 27 C57 mice were randomly divided into normal group and diabetes mice group, and the mice in diabetes group were fed with high fat food and intraperitoneal injected streptozocin. Then 1 mouse that random blood glucose lower than 16.9 mmol/L was deleted in diabetes group. The rest mice in diabetes group were divided into two groups, diabetes control group, pro3(GIP) group. Pro3(GIP) group was given drug pro3(GIP). The blood glucose and glucose tolerance were measured. After treatment for 6 weeks, all mice were sacrificed and fatty tissues were collected. **Results** After 6 weeks, the blood glucose of the pro3(GIP) group was obviously lower than diabetes control group ($t=8.43, P<0.01$), and insulin levers in 0, 30, 60 and 120 min were obviously lower than diabetes control group ($t=3.90, 2.60, 6.88$ and $3.33, P<0.05$). There was significant difference between pro3(GIP) group and diabetes control group about inflammatory cells. Moreover, leptin in pro3(GIP) group was obviously lower than in diabetes control group ($t=5.04, P<0.01$), but triglyceride, cholesterol, and adiponectin had no significant difference between two groups. **Conclusion** Pro3(GIP) can significantly reduce blood glucose, insulin level, leptin of diabetes mice, and attenuate the inflammatory cells infiltration in fatty issue.

Keyword: GIP receptor antagonist; pro3(GIP); streptozocin; diabetes mice; metabolic

糖依赖性胰岛素释放肽(glucose dependent insulinotropic peptide, GIP),又叫肠抑胃肽,由小肠K细胞分泌,为42个氨基酸组成的多肽,具有葡萄糖依赖促进胰岛素分泌的作用。而pro3(GIP)是GIP的类似物,其N端第三个氨基酸被脯氨酸(pro)所替换,具有GIP受体阻断效应^[1,2]。

动物研究表明,pro3(GIP)可以明显改善ob/ob小鼠的代谢状况^[3],但机制尚不明确。为了进一步研究pro3(GIP)对糖尿病代谢的影响,我们试图把pro3(GIP)应用于链脲佐菌素(STZ)及高脂饲料诱导的糖尿病小鼠,进一步探讨GIP在2型糖尿病(T2DM)发病中的作用,为糖尿病的治疗探索一种

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2014JQ4155)。

作者简介:党珊(1980—),女,硕士,副主任医师,主要从事消化、代谢病的诊治和研究。E-mail: brightsandy@126.com。

通讯作者:施秉银, E-mail: shibingy@126.com。

新方法。

1 材料和方法

1.1 研究对象 SPF级C57BL/6J雄性小鼠,5周龄,27只,由西安交通大学动物实验中心购入,并提供基础饲料。

1.2 仪器与试剂 高脂饲料、三诺血糖仪及试纸(江苏协同生物有限公司),GIP受体抑制剂[pro3(GIP)](康肽生物科技有限公司),链脲佐菌素(STZ, sigma公司),胰岛素、脂联素、瘦素的ELISA试剂盒(美国R&D公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组:27只小鼠按照体重进行随机分组,分为2组,正常喂食组9只和高脂喂食组18只,正常喂食组给予正常饲料的饮食,高脂喂食组给予高脂饲料。6周的高脂饮食后,隔夜禁食12 h不禁水,腹腔注射链脲佐菌素(STZ),按120 mg/kg的标准,STZ溶于pH=4.2~4.5的枸橼酸钠缓冲液。4周后,随机血糖 ≥ 16.9 mmol/L为小鼠糖尿病造模成功,选取造模成功的17只小鼠随机分为2组,分别为糖尿病组小鼠9只,pro3(GIP)组8只。

1.3.2 药物干预:pro3(GIP)溶于双蒸馏水中,按照25 nmol/kg^[2]每天进行腹腔注射,一共历经6周。

1.3.3 血糖和静脉葡萄糖耐量试验(IVGTT)的测定:每周日早晨9:00进行体重和随机血糖的测定。药物干预结束后,隔夜禁食16 h不禁水,先从尾静脉采集血液测血糖,后按照1.5 g/kg的量腹腔注射10 g/dl葡萄糖,在0,30,60,120 min进行尾静脉采血,分别测各点的血糖以及血清胰岛素。

1.3.4 动物处理:小鼠麻醉后,摘眼球取血,然后脱颈处死,取腹腔脂肪组织放于10 ml/dl福尔马林中,进行石蜡包埋和HE染色,通过显微镜观察脂肪在组织中的堆积情况,并观察脂肪组织形态,测量脂肪细胞的平均直径。

1.3.5 指标检测:小鼠的全血在低温高速离心机以3 000 r/min离心15 min得到血清,分为3份。在全自动血脂测量仪上进行血脂的测定,其余用于血清中脂肪因子脂联素及瘦素的测定。

1.4 统计学分析 实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 21.0软件包进行统计分析, t 检验进行两组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖的变化 腹腔注射pro3(GIP)后,小鼠的血糖均明显降低。虽然前4周pro3(GIP)组与糖尿病组相比较,血糖降低的幅度也较明显,但并

没有形成稳定的下降趋势。在5周后小鼠的血糖平稳下降。第5,6周,pro3(GIP)组的血糖水平平均较糖尿病组明显下降,且差异具有统计学意义($t = 9.442, P < 0.01; t = 8.43, P < 0.01$),见表1。

表1 各组小鼠随机血糖的变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

周数	小鼠随机血糖		
	正常组	糖尿病组	pro3(GIP)组
0	8.53 \pm 1.03	22.23 \pm 2.61	22.18 \pm 3.73
1	8.60 \pm 0.88	23.53 \pm 2.94	18.86 \pm 3.39
2	8.60 \pm 0.84	24.58 \pm 3.02	19.42 \pm 2.36
3	8.60 \pm 0.85	25.63 \pm 3.18	18.08 \pm 1.96
4	8.65 \pm 0.79	28.9 \pm 2.56	19.75 \pm 2.19
5	8.57 \pm 0.87	29.06 \pm 2.27	18.63 \pm 2.26
6	8.72 \pm 0.88	29.35 \pm 2.36	18.46 \pm 3.15

2.2 血脂的变化 小鼠腹腔注射pro3(GIP)6周后,测定血脂变化,发现pro3(GIP)组三酰甘油(1.27 \pm 0.09 mmol/L)和胆固醇(2.80 \pm 0.26 mmol/L)均较糖尿病组(1.55 \pm 0.23 mmol/L, 2.82 \pm 0.48 mmol/L)降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),糖尿病组的三酰甘油和胆固醇比正常组(1.12 \pm 0.30 mmol/L, 2.60 \pm 0.33 mmol/L)的升高,亦差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 葡萄糖耐量试验 应用pro3(GIP)6周后对小鼠按1.5 g/kg腹腔注射10 g/dl葡萄糖后,在60 min时,pro3(GIP)组小鼠血糖水平平均比糖尿病组小鼠的血糖低(25.95 \pm 2.04 mmol/L, 31.48 \pm 1.53 mmol/L),且差异具有统计学意义($t = 6.33, P < 0.01$)。在120 min时,pro3(GIP)组、糖尿病组小鼠的血糖分别为22.15 \pm 1.93 mmol/L, 26.28 \pm 1.47 mmol/L,差异有统计学意义($t = 2.77, P < 0.05$)。对4个时间点得到的血清进行胰岛素测定,糖尿病组小鼠0,30,60,120 min四个时间点的胰岛素水平均高于正常组及pro3(GIP)组,其中pro3(GIP)组的胰岛素水平明显低于糖尿病组,差异具有统计学意义($t = 3.90, 2.60, 6.88, 3.33$, 均 $P < 0.05$),见图1。

2.4 脂肪组织的炎症浸润 药物干预6周后,处死小鼠取脂肪组织进行病理染色发现,pro3(GIP)组和糖尿病组相比较,脂肪细胞中的炎症浸润减少,见图2,而且对100个脂肪细胞中的炎症细胞(CSLs:炎症细胞形成的花环状结构,可以用来判断炎症细胞的浸润情况)进行分析,发现pro3(GIP)组CSLs的个数明显少于糖尿病组的个数(5.50 \pm 1.04, 7.50 \pm 1.04),差异有统计学意义($t = 3.30, P < 0.01$)。

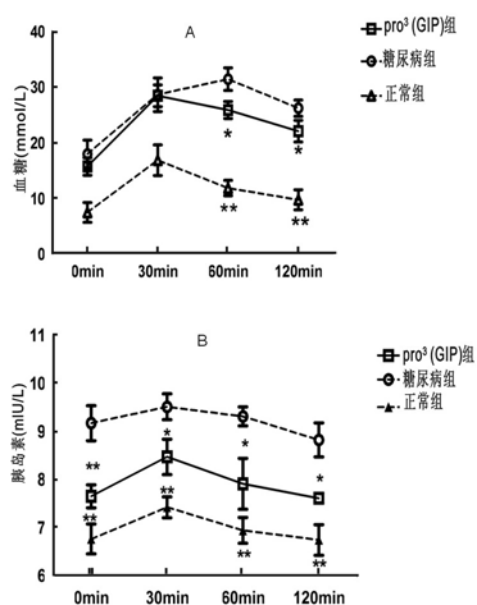
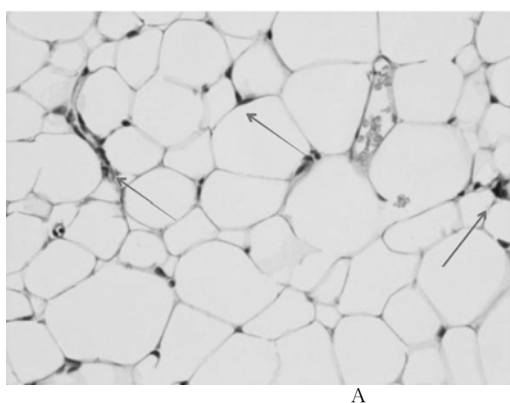
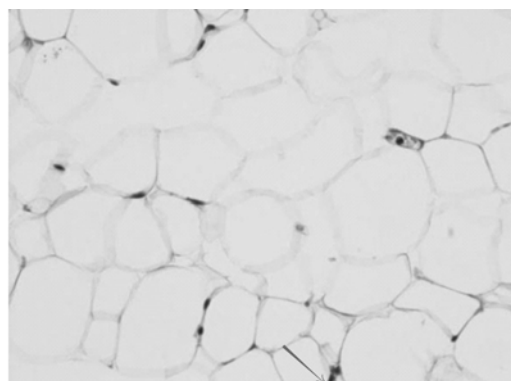


图1 葡萄糖耐量试验血糖及胰岛素水平



A



B

注:箭头:CSLs。

图2(A):糖尿病组脂肪组织,图2(B):pro3(GIP)组脂肪组织

的升高,从而促进胰岛 β 细胞不断的分泌胰岛素,最终形成了高胰岛素血症,导致胰岛素抵抗,加重糖尿病。Irwin等^[3]人把GIP受体抑制剂用在ob/ob小鼠上,发现其可明显降低血糖和三酰甘油,改善胰岛素抵抗。本实验进一步在高脂饲料和链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠上,验证了pro3(GIP)可以降低血糖水平,改善葡萄糖耐量。

肥胖一直是导致糖尿病的重要原因,减轻患者体重,改善肥胖状况,也一直是治疗糖尿病的手段之一。近年来大量的研究表明GIP和肥胖有重要的联系^[5,6]。此外,研究亦发现糖尿病的发病机制与脂肪组织的炎症有很大的关系,脂肪组织炎症发生干扰了胰岛的功能,导致胰岛功能紊乱,胰岛素抵抗,从而形成2型糖尿病^[7]。Miyawaki等^[8]人发现,GIP受体(-/-)小鼠对高脂饲料、高进食量引起的体重增加明显耐受,胰岛素抵抗明显降低,体外试验进一步发现GIP能够促进脂肪细胞吸收葡萄糖。Nie等^[9]发现肥胖患者体内GIP升高,而

2.5 脂肪因子 用ELISA法对小鼠血清的脂肪因子进行测定,发现pro3(GIP)组血清瘦素水平明显低于糖尿病组血清瘦素水平(787.19 ± 51.75 pg/ml, 896.23 ± 56.27 pg/ml),差异具有统计学显著性意义($t=5.04$, $P<0.01$)。但糖尿病组和pro3(GIP)组脂联素水平比较差异无统计学意义。

3 讨论 肠促胰素主要包括胰高血糖素(glucagon-like-peptide-1, GLP1)和GIP, GLP1和GIP主要经过DPP4降解。目前,用于糖尿病治疗的基于肠促胰素的药物主要包括GLP1受体激动剂和DPP4抑制剂,两者在糖尿病患者的治疗中都有明显的降糖作用, Mentis等^[4]人给2型糖尿病患者同时应用GIP及GLP1发现, GIP不仅不能加强GLP1的促胰岛素分泌、降糖作用,还能拮抗GLP1对胰高血糖素的抑制作用。Gault等^[2]人开发了GIP受体抑制剂[-pro3(GIP)],并解释在持续高血糖状况下, GIP反应性

GLP1水平下降^[10],进一步发现GIP通过促进脂肪炎症细胞因子、趋化因子来影响脂肪细胞的生理功能,促进基础状态下脂肪组织对葡萄糖的吸收,但抑制胰岛素刺激时葡萄糖的吸收,这说明GIP可能通过脂肪组织的炎症反应而引起胰岛素抵抗,从而加重糖尿病。本实验通过喂养高脂饲料联合注射链脲佐菌素形成胰岛 β 细胞的少量破坏,成功建立了糖尿病小鼠模型,虽然pro3(GIP)组和糖尿病模型组相比体重、血脂变化不显著,可能与样本量较小,或者测量方法仪器有待改进有关,但通过组织染色对比发现, pro3(GIP)组的脂肪组织中炎症浸润明显减少,这与已有研究结果基本一致,从另一角度验证了GIP和脂肪堆积可能有一定的关系,使用GIP受体抑制剂可以减轻脂肪炎症浸润,改善胰岛功能与糖脂代谢;另外,瘦素是由脂肪细胞释放的脂肪因子,它与下丘脑内的相应的受体结合后,调节体内的能量和食欲的平衡,并且发现其与胰岛素抵抗密切相关。我们在 (下转47页)

(上接 43 页)实验中发现糖尿病小鼠应用 pro3 (GIP)后,其血清的瘦素水平明显降低,由此可以说明,pro3(GIP)改善糖尿病小鼠的代谢作用可能与影响瘦素表达相关。

综上所述,本实验研究了 GIP 受体抑制剂对诱导的糖尿病小鼠的代谢尤其是糖代谢具有一定改善作用,与国外现有研究相同的是,GIP 受体抑制剂可以明显降低血糖及胰岛素分泌水平。我们进一步发现了其可以减轻脂肪组织的炎症浸润,作用机制可能与影响瘦素表达相关,这为进一步阐明糖尿病的发病机制,开发糖尿病新药治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Chan JC,Zhang Y,Ning G. Diabetes in China;a societal solution for a personal challenge[J]. Lancet Diabetes Endocrinol,2014,2(12):969-979.
- [2] Gault VA,O'Harte FP,Harriott P,et al. Characterization of the cellular and metabolic effects of a novel enzyme-resistant antagonist of glucose-dependent insulinotropic polypeptide [J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,290(5):1420-1426.
- [3] Irwin N,McClellan PL,O'Harte FP,et al. Early administration of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist pro3 (GIP) prevents the development of diabetes and related metabolic abnormalities associated with genetically inherited obesity in ob/ob mice[J]. Diabetologia, 2007, 50 (7): 1532-1540.
- [4] Mentis N,Vardarli I,Kothe LD,et al. GIP does not potentiate the antidiabetic effects of GLP-1 in hyperglycemic patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2011,60(4):1270-1276.
- [5] Goedecke JH,Micklesfield LK. The effect of exercise on obesity, body fat distribution and risk for type 2 diabetes[J]. Med Sport Sci,2014(60):82-93.
- [6] Lau E,Carvalho D,Pina-Vaz C,et al. Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes [J]. Hormones (Athens),2015,14(3):358-369.
- [7] van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus:causes and consequences[J]. Neth J Med,2013,71(4):174-187.
- [8] Miyawaki K,Yamada Y,Ban N,et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity[J]. Nat Med,2002,8(7):738-742.
- [9] Nie Y,Ma RC,Chan JC,et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide impairs insulin signaling via inducing adipocyte inflammation in glucose-dependent insulinotropic peptide receptor-overexpressing adipocytes[J]. FASEB J,2012,26(6):2383-2393.
- [10] Ranganath LR,Beety JM,Morgan LM,et al. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence[J]. Gut,1996,38(6):916-919.

收稿日期:2016-01-05

修回日期:2017-02-15