

依折麦布对 db/db 糖尿病小鼠胰岛分泌功能的影响

钟勇¹, 江时森¹, 王俊¹, 邵加庆², 卢斌², 顾萍²

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院 1. 心脏内科, 2. 内分泌科, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 依折麦布; 胰岛; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗

[摘要] **目的** 探讨依折麦布对 db/db 小鼠胰岛分泌功能的作用。**方法** 将8周龄的 db/db 小鼠随机分为2组, 分别给予6周依折麦布或安慰剂灌胃治疗, 同周龄的 db/m 小鼠作为非糖尿病对照。投药6周后行糖耐量试验后取胰腺, 进行胰岛素免疫组织化学检测, 另采用离体胰岛灌注系统测定胰岛素第一时相的分泌。**结果** 依折麦布组治疗6周后空腹血糖显著下降, 同时总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇低于对照组($P < 0.05$)。糖负荷120 min后葡萄糖曲线下面积低于 db/db 对照组($P < 0.05$), $AUC_{1NS0-30}$ 高于对照组($P < 0.05$)。离体胰岛灌注结果显示依折麦布组胰岛第一时相分泌得到改善。胰岛内胰岛素表达强度依折麦布组明显高于对照组。**结论** 依折麦布能改善糖耐量, 恢复胰岛第一时相分泌, 保护 β 细胞功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Beneficial Effects of Ezetimibe on Secretory Function of β -cell in db/db Mice

ZHONG Yong¹, JIANG Shi-Sen¹, WANG Jun¹, SHAO Jia-Qing², LU Bing², and GU Ping²

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Endocrinology, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

[KEY WORDS] Ezetimibe; Pancreatic Islet; Type 2 Diabetes; Insulin Resistanc

[ABSTRACT] **Aim** The aim of this study was to investigate whether ezetimibe has a protective effect on β -cell function in diabetic state. **Methods** 8-week-old db/db mice were randomized to ezetimibe 10 mg/(kg · d), or placebo. The age-matched nondiabetic littermates db/m mice were treated with placebo as the controls. After 6 weeks' treatment, intraperitoneal glucose tolerance test and immunohistochemical staining for insulin were performed. Islet perfusion were performed to evaluate kinetics of insulin release by using islet perfusion system. **Results** Fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) were lower in ezetimibe group than that in db/db group after 6 weeks' treatment. Ezetimibe provided an improvement of glucose tolerance and greatly rescued islet β -cell mass. Ezetimibe treatment also improved first-phase insulin response. **Conclusion** Ezetimibe treatment effectively improved glucose tolerance and β -cell function by significantly restored first-phase insulin secretion on db/db mice.

2型糖尿病患者常合并有脂代谢异常, 单纯控制血糖不能完全消除糖尿病患者发生冠心病等大血管并发症, 因此, 在控制血糖的同时, 必须进行调脂治疗。一项发表在 JAMA 的 Meta 分析显示, 与中等剂量他汀治疗相比, 大剂量强化他汀治疗增加新发糖尿病风险^[1]。CORALL 研究^[2]也表明在合并血脂代谢异常的 2 型糖尿病患者中, 大剂量他汀药物治疗可能会影响患者的血糖控制。依折麦布作为第一种选择性胆固醇吸

收抑制剂, 可单独或与他汀类药物联合用于治疗 2 型糖尿病合并高脂血症。临床研究表明依折麦布不仅可降低血脂, 同时可以改善 2 型糖尿病患者的糖代谢紊乱^[3]。动物实验发现依折麦布可以降低胰岛素抵抗肥胖大鼠空腹胰岛素水平及改善高脂诱导的糖耐量异常, 但机制尚不完全明确^[4]。本研究通过依折麦布干预对 db/db 糖尿病小鼠胰岛分泌功能的影响, 探讨依折麦布对胰岛的保护作用。

[收稿日期] 2012-03-16

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2011661)

[作者简介] 钟勇, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管病的分子机制, E-mail 为 zhongyongnj@yahoo.com.cn。江时森, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管病的分子机制, E-mail 为 wwwjiangshisen@sina.com。通讯作者顾萍, 博士后, 研究方向为胰岛素抵抗及代谢综合征, E-mail 为 11ping19762000@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

40 只 8 周龄清洁级雄性 db/db 小鼠,来自南京军区南京总医院比较医学科实验动物房,体重约 35~48 g,随机分为 2 组,每组 20 只,分别给予 6 周的依折麦布(益适纯, MSP SINGAPORE COMPANY LLC) 10 mg/(kg·d)(db/db 依折麦布治疗组,简称依折麦布组)和安慰剂(5%阿拉伯胶;db/db 安慰剂对照组,简称 db/db 对照组)。20 只同周龄同窝出生的 db/m 小鼠为非糖尿病对照(db/m 非糖尿病对照组,简称 db/m 对照组)。动物的处置均遵循实验动物看护原则。

1.2 生理生化指标检测

每周监测体重和血糖,投药前和 6 周后测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、空腹胰岛素(fasting serum insulin, FSI),血浆胰岛素测定使用小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(Morinaga, Yokohama, Japan)。胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)的计算采用公式: $ISI = \ln 1 / (FBS \times FSI)$ 。

1.3 腹腔葡萄糖耐量试验

投药 6 周后,每组随机选取 10 只小鼠行腹腔葡萄糖耐量试验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)。AUC-insulin 评价胰岛分泌功能, $AUC_{INS_{0-30}}$ 评价早期相的胰岛素分泌,计算公式: $AUC_{INS_{0-30}} = (INS_{30} - INS_0) \times 15$ 。

1.4 使用离体胰岛灌流系统对胰岛功能进行评价

胰岛分离:每组剩余 10 只小鼠苯巴比妥麻醉后,夹闭胆总管十二指肠乳头开口,胆总管穿刺注

射 1 g/L IV 型胶原酶 2 mL,迅速分离胰腺置于含 IV 型胶原酶的 Hank's 平衡液中消化 40 min,振荡洗涤后分离胰岛。胰岛灌流采用我们创建的离体胰岛灌流系统进行,留取灌流液测定胰岛素浓度并绘制胰岛素第一相分泌曲线。

1.5 免疫组织化学测定

苯巴比妥钠麻醉后剥离胰腺后置于 4% 多聚甲醛 4~6 h,石蜡包埋,利用 ABC 法检测胰岛素表达。 β 细胞胰岛素阳性染色区域为深棕色。

1.6 胰岛测量分析

采用 Image-Pro Plus 5.01 分析,胰岛 β 细胞含量(mg) = 胰岛 β 细胞面积/胰腺面积 \times 胰腺重量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,实验前后的资料比较用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 生理生化指标

基线时,依折麦布组和 db/db 对照组的 FBG、FSI、TG、LDLC 均无明显差异。在 8 周龄,db/db 小鼠的空腹血糖均已超过 15 mmol/L。依折麦布组在治疗 6 周后开始出现高血糖进展速度的减缓,6 周末时血糖显著低于 db/db 对照组($P < 0.05$)。6 周末时,依折麦布组 TG、LDLC 明显低于 db/db 对照组($P < 0.05$)。ISI 在基线时依折麦布组和 db/db 对照组无明显差异,投药 6 周后 ISI 显著高于 db/db 对照组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1. 各组基线及终点时糖、脂代谢指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Physiological and metabolic parameters ($\bar{x} \pm s$)

分 组	鼠数	体重(g)	FBG (mmol/L)	FSI (μ g/L)	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	ISI	
db/m 对照组	基线	20	29.10 \pm 0.33 ^a	5.51 \pm 0.53 ^a	2.43 \pm 0.23 ^a	2.65 \pm 0.41 ^a	1.65 \pm 0.22 ^a	-2.58 \pm 0.15
	终点	20	35.80 \pm 0.54 ^a	5.71 \pm 0.63 ^a	2.63 \pm 0.31 ^a	2.55 \pm 0.53 ^a	1.79 \pm 0.27 ^a	-2.69 \pm 0.19
db/db 对照组	基线	20	41.20 \pm 3.18	17.30 \pm 3.99	8.51 \pm 1.26	5.14 \pm 0.80	3.88 \pm 0.44	-4.95 \pm 0.32
	终点	20	50.20 \pm 4.32	25.9 \pm 2.00	9.55 \pm 1.20	5.86 \pm 0.85	4.91 \pm 0.37	-5.49 \pm 0.20
依折麦布组	基线	20	40.92 \pm 2.84	18.37 \pm 4.25	9.01 \pm 1.37	5.30 \pm 0.77	3.69 \pm 0.74	-5.07 \pm 0.34
	终点	20	45.40 \pm 3.81 ^a	18.82 \pm 3.99 ^a	7.58 \pm 0.67 ^a	4.21 \pm 0.63 ^a	2.78 \pm 0.62 ^a	-4.38 \pm 0.24

a 为 $P < 0.05$,与 db/db 对照组比较。

2.2 依折麦布对 db/db 小鼠 IPGTT 的影响

糖负荷后 120 min,依折麦布组的血糖显著降低($P < 0.05$),葡萄糖曲线下面积低于 db/db 对照组

($P < 0.05$),同时在 30 min 时血浆胰岛素水平升高,且 $AUC_{INS_{0-30}}$ 高于 db/db 对照组,提示依折麦布能改善糖耐量及早期相胰岛素分泌(图 1)。

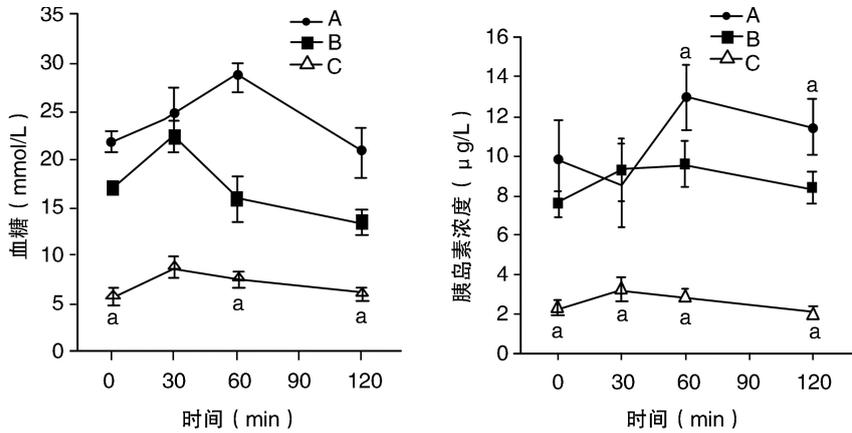


图1. 依折麦布对 db/db 糖尿病小鼠 IPGTT 的影响 A 为 db/m 对照组, B 为 db/db 对照组, C 为依折麦布组。a 为 $P < 0.05$, 与 db/db 对照组比较。

Figure 1. The impact of ezetimibe on IPGTT of db/db control mice

2.3 依折麦布对 db/db 小鼠胰岛第一时相分泌的影响

与 db/db 对照组比较, 依折麦布组在低糖灌流时胰岛素分泌无明显升高, 而给予 16.7 mmol/L 高糖刺激 1 min 后胰岛素分泌明显升高, 提示依折麦布组胰岛第一时相分泌得到改善, 但仍然低于 db/m

对照组(图2)。

2.4 依折麦布对 db/db 小鼠胰岛 β 细胞含量的影响

投药 6 周后, 定量分析表明 db/db 对照组的胰岛 β 细胞含量相当低, 依折麦布治疗极为显著地减少了胰岛 β 细胞的丢失(图3)。

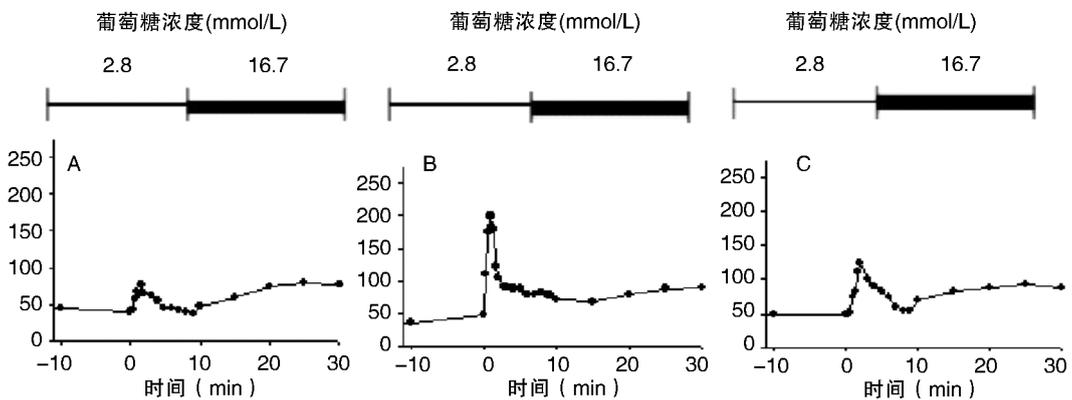


图2. 依折麦布组、db/db 对照组及 db/m 对照组离体胰岛灌流的结果 A 为 db/db 对照组, B 为 db/m 对照组, C 为依折麦布组。

Figure 2. Result of islet perfusion in three groups

3 讨论

依折麦布是全球第一种选择性胆固醇吸收抑制剂, 作用于小肠细胞的刷状缘, 通过抑制 NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like 1 protein) 转运蛋白活性, 选择性地抑制膳食和胆汁中的胆固醇跨小肠壁转运到肝脏中, 使得肝脏胆固醇储存减少, 导致肝脏 LDL 受体合成增加, 加速 LDL 代谢, 使血浆 LDLC 水平降低^[5]。

目前研究发现依折麦布作用位点 NPC1L1 转运

蛋白不仅在小肠表达, 在肝脏、胰腺、胆囊、睾丸、胃亦有表达^[6]。Chan 等^[7]研究发现在非酒精性脂肪肝患者中, 依折麦布不仅能减少肝内甘油三酯含量, 降低血浆超敏 C 反应蛋白 (high-sensitive C-reactive protein, hs-CRP)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein-4, RBP-4) 水平, 同时增加脂联素水平, 从而改善肝脏的脂肪变性、炎症反应和脂质代谢异常, 增加胰岛素敏感性。Nomura 等^[8]研究表明依折麦布通过抑制肝脏 NPC1L1 转运蛋白活性, 减少活性氧族物质

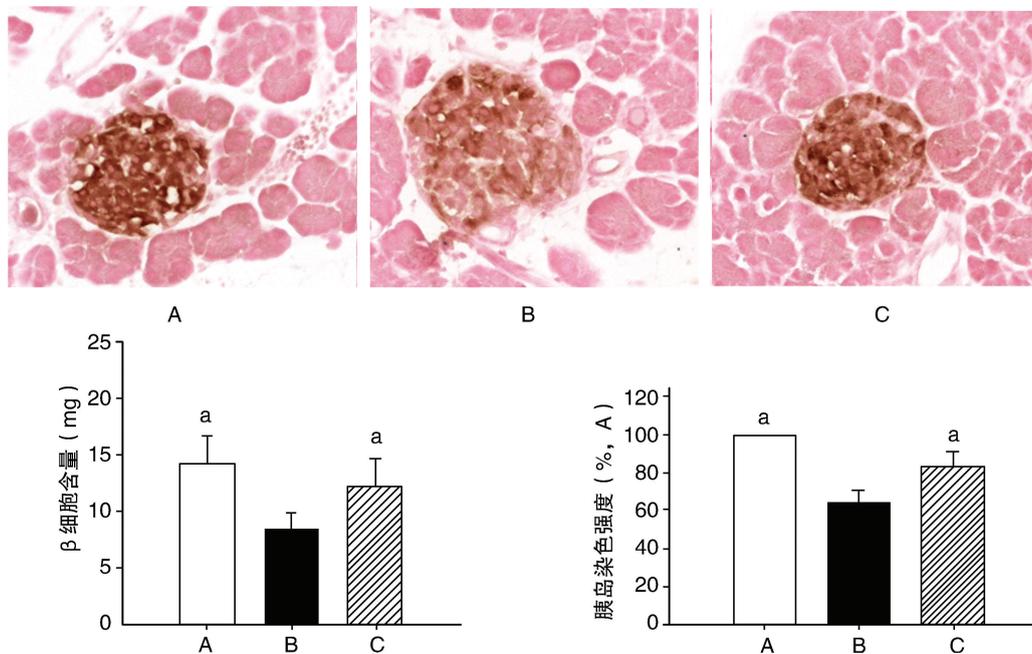


图 3. 各组大鼠胰腺胰岛素染色及胰岛 β 细胞含量、染色强度
0.05, 与 db/db 对照组比较。

A 为 db/m 对照组, B 为 db/db 对照组, C 为依折麦布组。a 为 $P <$

Figure 3. Insulin immunohistochemical staining and β cell amount and stain intensity in three groups

的生成,抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 的活性,降低未折叠或错误折叠的蛋白质引起内质网应激,促进胰岛素信号通路中 PI-3K/AKT 的磷酸化水平,从而改善肝脏胰岛素抵抗。虽然目前对肝胰岛素抵抗的研究关注较多,但依折麦布对胰岛的作用目前国内外报道甚少。Yang 等^[9]在糖尿病合并高脂血症的小鼠模型研究中证实,长期(20 周)服用依折麦布后可增加 β 细胞数量及胞浆中胰岛素的含量。本研究首次在国内采用 db/db 2 型糖尿病小鼠模型,通过依折麦布干预后发现,依折麦布在降低血脂的同时,可以降低血糖,改善葡萄糖耐量及胰岛第一时相分泌,提高胰岛素敏感性,减少胰岛内 β 细胞的丢失,保护 β 细胞功能。

第一时相胰岛素分泌异常是胰岛 β 细胞功能缺陷的早期表现。目前国内采用的评价方法多反映胰岛素分泌总量,而不能同时反映胰岛素在分泌时相和分泌数量方面的变化。本研究在国内首次采用离体胰岛灌流系统^[10],评估依折麦布干预后 db/db 小鼠胰岛 β 细胞第一时相分泌的变化,结果表明依折麦布组在低糖灌流时胰岛素分泌无明显升高,而给予 16.7 mmol/L 高糖刺激 1 min 后胰岛素分泌明显升高,提示依折麦布改善了 db/db 小鼠胰岛第一时相分泌,推断依折麦布对血糖的作用可能得益于第一时相的改善。

依折麦布改善糖尿病状态下的糖代谢机制未完全明确,其机制可能与改善外周胰岛素抵抗和调节信号通路有关。血浆中游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 持续升高可引起肌肉及肝脏胰岛素抵抗,糖异生增加,肌肉摄取糖减少;相反,持续降低体内 FFA 的含量,可改善糖耐量并提高外周胰岛素敏感性^[11]。依折麦布可直接抑制胆固醇吸收,降低体内 FFA 水平,改善胰岛素抵抗,降低血糖。另外,依折麦布通过抑制肝脏 NPC1L1 转运蛋白活性,抑制 JNK 激酶的活性,促进胰岛素信号通路中 PI-3K/AKT 的磷酸化水平^[8],改善肝胰岛素抵抗,但依折麦布对胰岛自身胰岛素信号通路的影响还有待研究。

综上所述,依折麦布能够改善胰岛 β 细胞第一时相分泌,降低血糖,提高胰岛素的敏感性,保护 β 细胞功能,为临床糖尿病合并高脂血症及动脉粥样硬化提供新的治疗思路。

[参考文献]

- [1] Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, et al. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis [J]. JAMA, 2011, 305 (24): 2 556-564.
- [2] Simsek S, Schalkwijk CG, Wolffenbuttel BH. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on glycaemic control in type 2 diabetes-the CORALL study [J]. Diab Med, 2011, 29

(5): 628-631.

- [3] Tsuyoshi Nozue, Ichiro Michishita, Ichiro Mizuguchi. Effects of ezetimibe on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes: a 12-week, open-label, uncontrolled, pilot study[J]. *Curr Ther Res*, 2010, 71(4): 252-258.
- [4] Michiyo Deushi, Mitsunori Nomura, Akio Kawakami, et al. Ezetimibe improves liversteatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(29): 5 664-670.
- [5] Dariusz Suchy, Krzysztof Labuzek, Antoni Stadnicki, et al. Ezetimibe-a new approach in hypercholesterolemia management[J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(6): 1 335-348.
- [6] Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1 201-204.
- [7] Chan DC, Watts GF, Gan SK, et al. Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(5): 1 134-139.

- [8] Nomura M, Ishii H, Kawakami A, et al. Inhibition of hepatic Niemann-Pick C1-like 1 improves hepatic insulin resistance[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(5): E1 030-038.
- [9] Yang SJ, Choi JM, Kim L, et al. Chronic administration of ezetimibe increases active glucagon-like peptide-1 and improves glycemic control and pancreatic beta cell mass in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(3): 153-157.
- [10] 邵加庆, 顾萍, 杜宏, 等. 建立离体胰岛灌流系统用于评估胰岛素第一相分泌功能[J]. *中华医学杂志*, 2010, 21(2): 134-138.
- [11] Bajaj M, Suraamornkul S, Kashyap S, et al. Sustained reduction in plasma free fatty acid concentration improves insulin action without altering plasma adipocytokine levels in subjects with strong family history of type 2 diabetes [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(9): 4 649-655.

(此文编辑 曾学清)

· 征稿征订 ·

2013 年《中华高血压杂志》征稿征订启事

《中华高血压杂志》(ISSN 1673-7245, CN 11-5540/R)系原《高血压杂志》,是卫生部主管,中华预防医学会、福建医科大学主办,福建医科大学附属第一医院承办的学术期刊,是国内目前唯一有关高血压及相关疾病诊疗防治科研的医学专业期刊。以普及高血压防治知识,交流高血压及相关疾病的临床防治经验与科研,介绍国内外最新动态为宗旨,坚持理论与实践、提高与普及相结合,百花齐放、百家争鸣的方针。本刊为美国《化学文摘社》(CA)收录期刊,被国内多家权威部门收录为核心期刊【中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊(扩展版)、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国生物医学核心期刊、中国医学核心期刊,中国学术期刊光盘版及有关医学数据库入编期刊、中国医学文摘内科学收录核心期刊】。

本刊的影响因子逐年提高,2010 年影响因子居全国心血管病类学术期刊第 1 位[《中国期刊引证报告(2011 年扩刊版和核心版)》]。本刊设有编辑部述评、海外前沿、学术争鸣、指南与实践、ARB 领先学院、 β 受体阻滞剂专栏、高血压一线、共识、综述、论著(包括临床医学、基础医学、预防医学)、临床经验交流、讲座、病例分析、中美互换摘要、国内外动态等栏目。欢迎提供学术争鸣题目及临床中特殊的病例,欢迎踊跃投稿。

本刊为月刊,每期 100 面,大 16 开,80g 铜版纸印刷,国内外发行,定价 15 元/册,全年定价 180 元。全国各地邮局订阅,邮发代号:34-54。编辑部亦可办理邮购,一次性订购 50 册及以上者,享受 8 折优惠,欢迎订阅!

编辑部地址:福州市茶中路 20 号福建医科大学附属第一医院内《中华高血压杂志》编辑部

邮政编码:350005

电话:0591-87982785;传真:0591-83574968

电子信箱:zhgxyzz@126.com

网址:http://www.zhgxyzz.cn