

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01189

Exenatide 抑制 2 型糖尿病胰岛素抵抗模型大鼠 JAK1/STAT1 的表达及胰岛 B 细胞凋亡

王奇金, 邹大进, 田建卿, 丁 薇, 丁长花, 冯正康

第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究生物活性肽 Exenatide 对 2 型糖尿病胰岛素抵抗模型大鼠组织 JAK1/STAT1 的表达及胰岛 B 细胞凋亡的影响。**方法** 用低剂量链脲佐菌素(STZ)联合高脂喂养的方法建立胰岛素抵抗大鼠模型, 分别用 Exenatide、二甲双胍和生理盐水作用于模型大鼠。检测大鼠糖化血红蛋白(HbA_{1c})、空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FBG)等生化指标、计算胰岛素敏感指数(ISI), 观察 Exenatide 对胰岛素抵抗模型大鼠的疗效。蛋白质印迹法检测大鼠胰岛组织 JAK1 转录激活子 1 (STAT1) 的蛋白表达水平; Annexin-V/PI 染色法比较各组胰岛 B 细胞对氧化应激诱发的细胞凋亡率。**结果** 与生理盐水对照组相比, Exenatide 治疗组 ISI 增高, 糖化血红蛋白降低(P 均 <0.05)。与生理盐水对照组和二甲双胍治疗组相比, Exenatide 组胰岛组织中 JAK1/STAT1 蛋白表达水平降低($P<0.01$), 且 H₂O₂ 诱发的胰岛 B 细胞凋亡率降低($P<0.01$)。**结论** Exenatide 可能通过调节 JAK1/STAT1 的表达, 改善胰岛素抵抗, 抑制 B 细胞凋亡。

[关键词] 2 型糖尿病; 艾塞那肽; 胰岛素抵抗; JAK1/STAT1; 细胞凋亡

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1189-04

Exenatide inhibits JAK1/STAT1 expression and B cell apoptosis in insulin resistant rat model of type 2 diabetes mellitus

WANG Qi-jin, ZOU Da-jin, TIAN Jian-qing, DING Wei, DING Chang-hua, FENG Zheng-kang

Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of Exenatide on JAK1/STAT1 expression in the islet tissues and apoptosis of pancreatic B-cell in type 2 diabetic rat model with insulin resistance. **Methods** Insulin resistant type 2 diabetic rat model was induced by combined treatment with high-fat diet and low-dose streptozotocin. The model rats were treated with Exenatide (Ex), metformin (Met) or normal saline (NS); the serum glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), fasting insulin (FINS), and fasting plasma glucose (FBG) were observed and the insulin sensitivity index was calculated to evaluate the therapeutic effects of Exenatide on insulin resistance. Western blotting analysis was performed to detect the protein expression of JAK1/STAT1 in the islet tissues. Annexin/PI staining assay was used to evaluate B-cell apoptosis induced by oxidative stress. **Results** Ex group showed a significantly elevated ISI and a reduced HbA_{1c} level compared with NS group ($P<0.05$). JAK1/STAT1 expression and H₂O₂-induced B-cell apoptosis rate were significantly lower in Ex group than in Met and NS groups ($P<0.01$). **Conclusion** Exenatide can improve insulin sensitivity and inhibit B-cell apoptosis, probably by regulating the expression of JAK1/STAT1.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; Exenatide; insulin resistance; JAK1/STAT1; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1189-1192]

胰高血糖素样肽 1 (glucagons-like peptide-1, GLP1) 是胰高血糖素原基因的翻译产物通过 C 端剪切形成的肠促胰岛素, 具有调节脂肪代谢、促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素生成、刺激胰岛 B 细胞的增殖与分化、抑制 B 细胞凋亡等多项生理功能^[1-2]。但

由于 GLP1 在血浆的半衰期只有 90 s, 限制了其生理功能的发挥。

Exendin 4 是从钝尾毒蜥蜴的唾液中提取的类似肠促胰岛素的生物活性肽, 与 GLP1 的氨基酸序列有 53% 的同源性, 并与 GLP1 的受体具有高度亲

[收稿日期] 2010-06-08 **[接受日期]** 2010-08-25

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑课题(2006BAI02B08)。Supported by National “11th Five-year Plan” for Sci-Tech Supporting Program (2006BAI02B08)。

[作者简介] 王奇金, 硕士, 主治医师。E-mail: wangqijin8668601@163.com

和力^[3-4]。Exenatide 为 Exenidin 4 的人工合成物,由于其 N 端不被 DPP IV 分解,故在血浆中的半衰期更长,具备更好的临床应用价值。Exenatide 的临床使用使部分二甲双胍、磺脲类药物或二甲双胍联合磺脲类药物等治疗方案不能达标的 2 型糖尿病患者症状得到了有效的缓解。由于其不仅有促进胰岛素分泌、保护 B 细胞的功能,还有降低体质量、纠正代谢紊乱、保护心血管、增强记忆力等作用^[5-7],目前 Exenatide 的应用指征有扩大的趋势。为了更安全、有效地促进 Exenatide 的临床应用,需要对其作用特点和机制进行深入的研究。

本研究在高糖高脂诱导的大鼠胰岛素抵抗模型基础上,观察 Exenatide 的调节糖代谢和胰岛素敏感性的作用,并进一步分析其对胰岛 B 细胞凋亡的影响,探讨可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料和设备 3 个月龄 SD 大鼠,雄性,清洁级,体质量 180~200 g,购于上海实验动物中心,饲养于第二军医大学实验动物中心清洁级动物室。链脲佐菌素 (STZ) 和 Exenatide 购自 Sigma-Aldrich 公司。RPMI 1640 购自 Invitrogen 公司。Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自 Biovision 公司。JAK1、STAT1 抗体购自 Sigma 公司,相应的辣根过氧化物酶标记的二抗购自上海生工生物工程技术服务有限公司。 β -actin 抗体和 ECL 显色检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司。细胞总蛋白裂解液购自 Pierce 公司,0.45 μ m NC 膜购自 Pharmacia 公司。胰岛素放射免疫分析药盒购自天津九鼎医学生物工程公司。糖化血红蛋白 A_{1c} (HbA_{1c}) ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。One Touch II 型血糖仪及其试纸为 Lifescan 公司产品;HITACH 7170 型自动生化分析仪为日立公司产品;光学显微镜及摄像系统为 Nikon 公司产品。FacsCalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 动物造模分组和给药 动物模型参照文献报道,加以改良^[8]。取 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 1 周后,随机分为造模组 50 只,每日给予高脂饲料(碳水化合物占总热量 15.5%、脂肪占 66.4%、蛋白占 18.1%),自由饮水;正常组 10 只,常规饲养(碳水化合物占总热量 66.5%、脂肪占 10.2%、蛋白占 23.3%)。30 d 后,造模组大鼠禁食 12 h,链脲佐菌素 (STZ)/枸橼酸缓冲液 30 mg/kg 腹腔注射。72 h 后检测空腹血糖和尿糖水平,血糖 >16.7 mmol/L 且尿糖检测在 ++ 以上为造模成功。正常组仅予以等量的 1% 枸橼酸缓冲液 (pH 4.0) 腹腔注射。造模后

继续原饲料饲养,稳定 3 d 开始给药,将造模成功大鼠随机分为 3 组:Exenatide 组 (Ex 组),予 Exenatide 3 μ g/kg,2 次/d 皮下注射;二甲双胍组 (Met 组),予二甲双胍 100 mg/kg,2 次/d 灌胃给药;模型对照组予自来水灌胃。正常组予自来水灌胃。连续用药 6 周。

1.3 标本获取及生化指标检测 用药 6 周后,以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血约 8 ml,用于 HbA_{1c}、血清胰岛素 (FINS)、血糖 (FBG)、胰岛素敏感指数 (ISI) 等生化指标检测。氧化酶法测血糖,放射免疫法测胰岛素,ELISA 法检测 HbA_{1c},胰岛素敏感指数 (ISI) = $-\ln(\text{FBG} \times \text{FINS})$ 。然后将大鼠断颈处死,分离胰腺组织,参照文献报道用胶原酶消化法制备胰岛组织^[8-9]。

1.4 蛋白质印迹法检测 JAK1/STAT1 的蛋白表达变化 各组大鼠胰岛组织用蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Noridet P40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 150 mmol/L NaCl, 1 粒蛋白酶抑制剂片剂,总体积为 50 ml) 提取细胞总蛋白,蛋白定量后,经聚丙烯酰胺凝胶分离,电转模到 NC 膜,蛋白质印迹检测 JAK1、STAT1 蛋白表达变化。以 β -actin 为内参,具体步骤参照《分子克隆实验指南》(第 2 版)的方法操作。

1.5 细胞凋亡检测 胰岛组织 B 细胞培养于 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清 (FBS), 1% 青链霉素, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 11.1 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L HEPES 和 0.05 mmol/L 2-巯基乙醇)。Ex 组细胞培养体系中补充 100 nmol/L Exenatide,在 37°C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h。收集经过 4 或 8 mmol/L H₂O₂ 处理/未处理 24 h 的细胞,与 Annexin V/PI 共孵育,用流式细胞仪检测细胞凋亡,具体操作参照试剂盒说明进行。

1.6 统计学处理 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每次实验均重复 3 次。采用 SPSS Ver 10.0 统计软件,单因素方差分析比较组间差异。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Exenatide 对糖尿病大鼠 HbA_{1c}、FBG、FINS、ISI 的影响 与正常组比较,模型组与各治疗组 FBG 均升高,差异有统计学意义,说明造模成功。各模型组 FINS 水平高于正常组,同时血糖浓度在模型对照组维持在高水平,提示有胰岛素抵抗存在。Ex 组 HbA_{1c}、FINS、FBG 水平均低于模型对照组 ($P < 0.05$),而 ISI 高于模型对照组 ($P < 0.05$)。与模型组比较,Met 组 HbA_{1c}、FINS、FBG 水平也有降低,

ISI 指数升高, 但不如 Ex 组差异变化明显, 见表 1。校正胰岛素抵抗因素后, Ex 组的胰岛素分泌指数较

模型对照组升高, 说明 Exenatide 对胰岛素分泌具有促进作用。

表 1 Exenatide 对糖尿病模型大鼠 HbA_{1c}、FBG、FINS、ISI 的影响

Tab 1 Effects of Exenatide on HbA_{1c}, FBG, FINS and ISI in diabetic rat models

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	HbA _{1c} (%)	FBG c _B /(mmol · L ⁻¹)	FINS c _B /(μmol · L ⁻¹)	ISI
Normal control	10	2.8 ± 0.43	5.7 ± 0.27	102.5 ± 8.65	-6.37 ± 0.38
Model control	16	3.8 ± 0.65	21.6 ± 1.74 [△]	248.6 ± 18.91	-8.59 ± 0.45
Metformin treatment	17	3.2 ± 0.57	16.6 ± 1.24 * [△]	184.5 ± 12.74 *	-8.03 ± 0.39
Exenatide treatment	17	2.9 ± 0.38 *	13.8 ± 1.16 * [△]	133.7 ± 9.88 *	-7.52 ± 0.36 *

* $P < 0.05$ vs model control group; [△] $P < 0.05$ vs normal control group

2.2 Exenatide 对糖尿病大鼠胰岛组织中 JAK1/STAT1 蛋白表达水平的影响 如图 1 所示, 模型对照组的 JAK1、STAT1 蛋白表达水平与正常对照组相比有明显升高趋势, 而 Exenatide 治疗组 JAK1、STAT1 均明显降低 ($P < 0.01$), 与正常组表达水平相似; Met 组的 JAK1、STAT1 蛋白表达水平与模型对照组相比稍有下降, 但差异无统计学意义。结合 Exenatide 治疗实验结果, 提示 JAK1/STAT1 通路参与 Exenatide 调节血糖和胰岛素敏感性的作用。

2.3 Exenatide 抑制 H₂O₂ 诱导的胰岛 B 细胞凋亡 凋亡分析结果显示, 4 mmol/L H₂O₂ 处理 24 h 导致各组细胞 (除 Ex 组外) 的凋亡率均升高, 较高浓度 (8 mmol/L) 的 H₂O₂ 效果更加明显, 与未处理组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而 100 nmol/L Exenatide 对这种氧化应激引起的细胞凋亡起到了有效的保护作用。Ex 组的细胞凋亡率基本维持在基础水平, 与其他各 H₂O₂ 处理组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

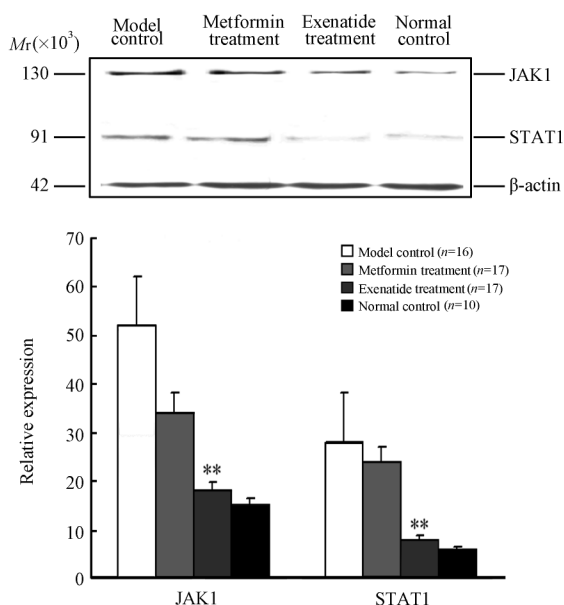


图 1 Exenatide 治疗后胰岛组织 JAK1、STAT1 的蛋白表达

Fig 1 Protein expression of JAK1/STAT1 in islet tissues after Exenatide treatment

** $P < 0.01$ vs model control

表 2 Exenatide 对 H₂O₂ 诱导的胰岛 B 细胞凋亡的保护作用

Tab 2 Protective effect of Exenatide against H₂O₂-induced B cell apoptosis

(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	H ₂ O ₂ c _B /(mmol · L ⁻¹)		
		0	4	8
Normal control	10	1.99 ± 0.42	6.94 ± 0.53	18.55 ± 1.41
Model control	16	2.98 ± 0.46	8.65 ± 0.94	20.51 ± 1.74
Metformin treatment	17	2.54 ± 0.48	7.68 ± 0.54	16.59 ± 1.85
Exenatide treatment	17	2.47 ± 0.33	3.25 ± 0.43 **	3.61 ± 0.64 ** *

** $P < 0.01$ vs model control group

3 讨论

GLP1 能通过 cAMP 活化, 激活 cAMP 依赖性第二信号途径, 促进 B 细胞分泌胰岛素, 并诱导胰岛

素合成和 B 细胞增殖^[9-10]。Exenatide 作为 GLP1 类似物, 在血糖浓度增高时, 能提高 cAMP 水平, 促进胰岛素的分泌^[6]。由于其作用具有血糖浓度依赖性, 所以不会发生低血糖反应, 在临床上有很好的应

用前景。

本研究中,通过糖尿病胰岛素抵抗模型大鼠的研究发现,Exenatide能有效降低空腹血糖和糖化血红蛋白水平,其疗效相对优于二甲双胍组。连续6周疗程结束后,大鼠血清胰岛素水平没有明显升高,与模型对照组相比降低,可能是因为通过治疗,随着空腹血糖水平的下降,其促胰岛素的作用也相对降低,这也从另一方面说明了Exenatide促进胰岛素敏感性的作用。国外研究也证明,Exenatide能促进胰岛增殖,改善B细胞功能,降低基础血糖水平,并提高胰岛素的敏感性^[11]。

本研究还通过蛋白质印迹检测发现在Exenatide处理的胰岛组织细胞中JAK1和STAT1的蛋白表达水平都下降(分别降低约55%和64%)。Couto等^[12]也报道Exenatide能导致大鼠JAK1和STAT1基因转录水平降低。JAK1-STAT1是调节 γ 干扰素转录调节通路的主要信号途径,该通路在1型糖尿病的B细胞凋亡中发挥重要的作用^[13-14],因此Exenatide抑制JAK1-STAT1的作用可应用于以后1型糖尿病的治疗。STAT1是介导白介素 1β 和TNF α 诱发细胞凋亡的关键因子。STAT1(-/-)小鼠对链脲霉素诱导的糖尿病和 γ 干扰素和白介素 1β 诱发的B细胞凋亡有一定的抵抗作用^[15]。因此,Exenatide可能通过JAK1-STAT1的抑制,对各种因素导致的B细胞具有保护作用。我们利用H₂O₂诱发的B细胞凋亡实验进一步证明了Exenatide对抗氧化应激诱发的细胞凋亡具有明显的保护作用。Exenatide处理后,胰岛B细胞的凋亡率与其他各组相比均降低,接近未处理组的凋亡水平。

总之,本研究发现,Exenatide能有效调节糖尿病模型大鼠的血糖水平,提高胰岛素的敏感性,对于氧化应激诱发的B细胞凋亡具有明显的保护作用,其机制可能与JAK1-STAT1表达抑制,从而阻断 γ 干扰素信号通路相关。

[参考文献]

- [1] Cornu M, Modi H, Kawamori D, Kulkarni R N, Joffraud M, Thorens B. Glucagon-like peptide-1 increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285:10538-10545.
- [2] Vilsbøll T. The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11(Suppl 3):11-18.
- [3] Arakawa M, Ebato C, Mita T, Hirose T, Kawamori R, Fujitani

Y, et al. Effects of exendin-4 on glucose tolerance, insulin secretion, and beta-cell proliferation depend on treatment dose, treatment duration and meal contents[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390:809-814.

- [4] Eng J, Kleinman W A, Singh L, Singh G, Raufman J P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267:7402-7405.
- [5] Bradley D P, Kulstad R, Schoeller D A. Exenatide and weight loss[J]. *Nutrition*, 2010, 26:243-249.
- [6] Chakraborti C K. Exenatide: a new promising antidiabetic agent[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72:1-11.
- [7] Gedulin B R, Nikoulina S E, Smith P A, Gedulin G, Nielsen L L, Baron A D, et al. Exenatide (exendin-4) improves insulin sensitivity and β -cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight[J]. *Endocrinology*, 2005, 146:2069-2076.
- [8] 李桂云, 吴正治. STZ建立2型糖尿病大鼠模型的剂量探讨[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2007, 17:74-77.
- [9] Doyle M E, Egan J M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 113:546-593.
- [10] Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile M J, Kergoat M, Portha B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4[J]. *Diabetes*, 2002, 51:1443-1452.
- [11] Nielsen L L, Young A A, Parkes D G. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes[J]. *Regul Pept*, 117:77-88.
- [12] Couto F M, Minn A H, Pise-Masison C A, Radonovich M, Brady J N, Hanson M, et al. Exenatide blocks JAK1-STAT1 in pancreatic beta cells[J]. *Metabolism*, 2007, 56:915-918.
- [13] Chang J H, Kim Y J, Han S H, Kang C Y. IFN-gamma-STAT1 signal regulates the differentiation of inducible Treg: potential role for ROS-mediated apoptosis[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39:1241-1251.
- [14] Suk K, Kim S, Kim Y H, Kim K A, Chang I, Yagita H, et al. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death[J]. *J Immunol*, 2001, 166:4481-4489.
- [15] Gysemans C A, Ladrrière L, Callewaert H, Rasschaert J, Flamez D, Levy D E, et al. Disruption of the gamma-interferon signaling pathway at the level of signal transducer and activator of transcription-1 prevents immune destruction of beta-cells[J]. *Diabetes*, 2005, 54:2396-2403.

[本文编辑] 孙岩