

· 论 著 ·

人胰高血糖素样肽-1 类似物基因治疗对 STZ 诱导糖尿病大鼠的拮抗作用*

李晓丽^{1,2}, 刘 振¹, 马卫列¹, 张志珍^{1,2,△}

(广东医学院:1. 生物化学与分子生物学教研室, 湛江 524023; 2. 衰老研究所, 东莞 523808)

摘要:目的 观察人胰高血糖素样肽-1(hGLP-1)类似物基因对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠的拮抗作用。方法 将 SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、空载体对照组及基因治疗拮抗组, 每组 10 只。应用小剂量、多次给药的方式诱导糖尿病大鼠模型, 观察 hGLP-1 类似物基因对大鼠血糖、血清胰岛素及胆固醇水平的影响。借助荧光显微镜观察绿色荧光蛋白在不同组织中的表达情况; 采用免疫组化分析胰岛细胞中胰岛素的表达水平。结果 与糖尿病模型组和空载体对照组比较, 基因治疗拮抗组糖尿病大鼠血糖水平下降、血清胰岛素水平升高、血清胆固醇水平下降。胰岛素免疫组化分析证实, 胰岛细胞中胰岛素得以表达, 基因治疗可使受损的胰岛细胞功能恢复。结论 hGLP-1 类似物基因治疗对 STZ 诱导的糖尿病症状具有拮抗作用, 改善糖尿病大鼠血糖、血清胰岛素和血脂水平。

关键词:糖尿病; 人胰高血糖素样肽-1 类似物基因; 基因治疗; 拮抗

中图分类号: R587.105

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)13-1639-03

Antagonism of human glucagon-like peptide-1 analog gene on streptozotocin-induced diabetic rats*

LI Xiao-li^{1,2}, LIU Zhen¹, MA Wei-lie¹, et al.

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhanjiang 524023, China;

2. Institute of Aging, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To investigate the antagonism of human glucagon-like peptide-1 (hGLP-1) analog gene on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat models. **Methods** SD rats were divided randomly into four groups (10 each): normal control group, diabetic group, empty plasmid pIRES2-EGFP treated group, and recombinant plasmid pIRES2-EGFP/hGLP-1 treated group. The diabetic rat models were induced by repeated intraperitoneal injection of small dose STZ. The effects of hGLP-1 analog gene on blood glucose, serum insulin level, and total cholesterol in diabetic models were analyzed. The expression of GFP was detected with fluorescence microscopy, and the insulin expression was also observed using immunohistochemistry staining method. **Results** Compared with diabetic model group and empty plasmid group, the blood glucose level of pIRES2-EGFP/hGLP-1 treated rats were decreased remarkably, and the circulating insulin levels were significantly increased, while the serum total cholesterol were decreased. Fluorescence microscopy and immunohistochemistry staining observed the expression of green fluorescent protein GFP and insulin. **Conclusion** hGLP-1 analog gene can improve blood glucose, serum insulin and total cholesterol, and have antagonism effects on STZ-induced diabetic rat models.

Key words: diabetes mellitus; hGLP-1 analog gene; gene therapy; antagonism

目前, 糖尿病患病率呈增长趋势, 已成为中国继心血管疾病、肿瘤之后的第 3 位疾病^[1]。人胰高血糖素样肽-1 (human glucagon-like peptide-1, hGLP-1) 是一种肠促胰岛素激素, 能有效降低血糖, 促进胰岛素分泌, 促进胰岛 β 细胞增殖并抑制其凋亡, 在糖尿病基因治疗中具有很大潜力^[2-3]。本课题组在前期研究中, 已成功构建了 hGLP-1 类似物基因 ($2 \times \text{Val}^2$ -hGLP-1) 重组表达质粒^[4], 本实验旨在将这一重组质粒通过尾静脉注射导入体内, 观察其对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠的拮抗作用, 为临床治疗提供一定的实验基础。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 200~220 g, 由广东医学院实验动物中心提供, 许可证号: SCSK(粤) 2008-0008。

1.2 实验材料与试剂 STZ (Merck 公司), 葡萄糖检测试剂

盒、总胆固醇检测试剂盒 (上海荣盛生物科技有限公司), 胰岛素检测试剂盒 (Beckman coulter 公司), 兔抗大鼠胰岛素抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (北京博奥森生物科技有限公司), DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒 (碧云天生物技术研究所), 质粒 DNA 大提试剂盒 (天根生物科技有限公司), 阳离子脂质体 (Lipofectamine Invitrogen 公司), 空载体 pIRES2-EGFP (Invitrogen 公司), hGLP-1 类似物基因重组表达质粒 ($p\text{IRES2-EGFP}/2 \times \text{Val}^2$ -hGLP-1, 由本室构建)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病模型建立及实验分组 将大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、空载体对照组、基因治疗拮抗组, 每组 10 只。糖尿病模型组、空载体对照组和基因治疗拮抗组于实验开始后第 7、8、9、10、11 天连续腹腔注射 STZ。每组大鼠分别在实验前 1 d 禁食 12~14 h, 自由进水, 次日清晨按 40 mg/kg 体

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (7009923); 广东省科技计划项目 (2008B030301031); 东莞市高等院校科研机构科技计划项目 (2008108101030); 湛江市科技招标项目 [(2008)74]。△ 通讯作者, E-mail: zzzhang@gdmc.edu.cn。

表 1 hGLP-1 基因拮抗治疗对糖尿病大鼠血糖、胰岛素及总胆固醇含量的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖(mol/L)		血清胰岛素(mIU/L)		总胆固醇(mmol/L)	
	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后
正常对照组	4.85±0.65	5.01±1.03	19.86±1.31	20.08±0.98	1.56±0.16	1.48±0.07
空载体对照组	26.32±2.71 [▲]	30.70±1.89 ^{*▲}	4.98±1.21 [▲]	4.45±0.89 ^{*▲}	2.35±0.21 [▲]	2.49±0.38 [▲]
糖尿病模型组	27.41±1.38 [▲]	30.24±1.78 ^{*▲}	4.82±1.04 [▲]	4.25±0.97 ^{*▲}	2.29±0.44 [▲]	2.51±0.16 ^{*▲}
基因治疗拮抗组	25.96±1.24 [▲]	19.97±1.38 ^{*△}	4.74±1.05 [▲]	8.24±0.97 ^{*△}	2.41±0.34 [▲]	2.09±0.21 ^{*△}

与实验前比较, * : $P < 0.01$, # : $P < 0.05$; 与糖尿病模型组、空载体对照组比较, △ : $P < 0.01$; 与正常对照组比较, ▲ : $P < 0.01$ 。

质量腹腔注射 1%STZ, 并连续注射 5 d^[5-6], 其中基因治疗拮抗组于第 1 天通过尾静脉注射阳离子脂质体包裹的重组质粒溶液 70 μg/只, 并于第 10 天加强 1 次; 空载体对照组按相同方式给予脂质体包裹的空载体溶液; 正常对照组给予等体积生理盐水。

1.3.2 小量多次给 STZ 后各组糖尿病成模率 于实验第 1、5、10、15、20 天将大鼠空腹 12 h, 眼眶静脉窦采血, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 按试剂盒说明书进行血糖测定, 计算各组大鼠成模率。

1.3.3 血糖、血清胰岛素及总胆固醇含量测定 实验前、后, 按照上述方法采血并按试剂盒说明书检测血糖、血清胰岛素、总胆固醇水平。

1.3.4 组织细胞中 hGLP-1 表达的观察 实验结束后, 将大鼠处死, 迅速取出肾脏、肝脏和肌肉组织制作组织印片, 借助荧光显微镜观察组织细胞中绿色荧光蛋白(GFP)的表达。

1.3.5 免疫组化分析胰岛中胰岛素分泌水平的变化 实验结束后, 将大鼠处死, 迅速取出胰腺组织, 置于 10% 的甲醛中固定, 石蜡包埋切片, 厚度为 4 μm, 常规脱蜡至水, 用 3% 的 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 微波加热暴露抗原, 滴加兔抗大鼠胰岛素抗体(1:100), 4 °C 过夜, 用 PBS 洗涤后滴加羊抗兔二抗, 于 37 °C 孵育 1 h, DAB 显色 3~5 min, 脱水、透明、封片后进行观察。采用 Imagepro Plus 图像分析软件, 每张切片随机选取 10 个视野, 分析胰岛素染色平均光密度(mean density) = 光密度总和(IOD SUM)/胰岛素染色面积(area)。

1.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

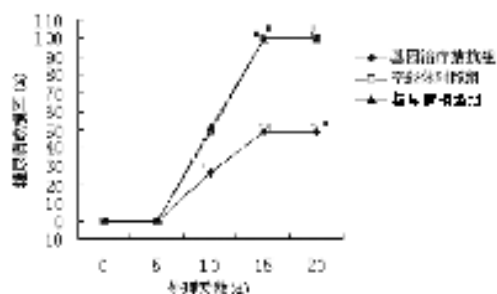
2 结果

2.1 STZ 处理后大鼠糖尿病成模率 见图 1。以相同方式给予 STZ 后, 各组大鼠的糖尿病成模率出现显著差异。基因治疗拮抗组大鼠糖尿病成模率在 STZ 处理后第 10、15、20 天, 分别为 26.01%、48.69%、48.69%, 显著低于糖尿病模型组和空载体对照组(48.25%、100%、100%, $P < 0.01$)。STZ 处理后 5~15 d, 各组大鼠的糖尿病成模率均上升($P < 0.01$)。

2.2 实验前、后大鼠血糖、血清胰岛素及总胆固醇含量 各组大鼠的血糖、胰岛素及胆固醇含量见表 1。基因治疗拮抗组大鼠给予 hGLP-1 类似物基因后, 其糖尿病症状得到缓解, 与糖尿病模型组、空载体对照组比较, 其血糖水平显著降低, 血清胰岛素水平明显升高, 同时总胆固醇水平也明显改善($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.3 组织细胞中 hGLP-1 表达分析 见图 2。荧光显微镜观察到绿色荧光蛋白(GFP)在肝脏(图 A)、肌肉组织(图 B)及肾脏(图 C)中的表达。本实验采用 pIRES2-EGFP 真核表达载

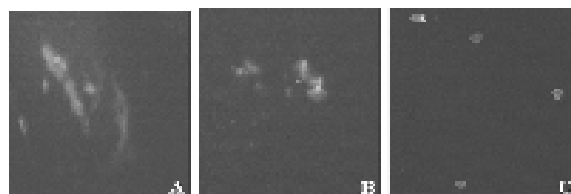
体, 该载体多克隆位点和 EGFP 编码区基因之间设计有核糖体进入位点(IRES), 能够确保插入的 hGLP-1 类似物基因与 GFP 编码基因共同转录, 荧光显微镜观察到 GFP 表达, 初步证明了载体已转入糖尿病大鼠体内, 并在组织中表达。



与糖尿病模型组和空载体对照组比较, * $P < 0.01$; 与处理后第 10 天比较, # $P < 0.01$ 。

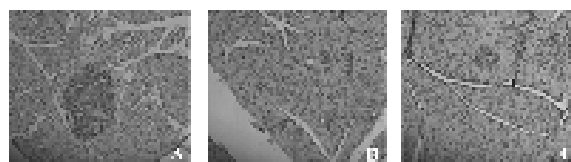
图 1 STZ 处理后大鼠糖尿病成模率

2.4 胰岛素分泌水平的变化 见图 3。与正常对照组(图 A)比较, 糖尿病模型组(图 B)和基因治疗拮抗组(图 C)胰岛内胰岛素分泌颗粒减少。但经过 hGLP-1 类似物基因治疗后, 基因治疗拮抗组胰岛素染色阳性区域的平均光密度(99.91 ± 10.01)显著高于糖尿病模型组(91.46 ± 8.23 , $P < 0.05$)。



A: 肝脏; B: 肌肉组织; C: 肾脏。

图 2 组织细胞中 hGLP-1 表达的观察 (×100)



A: 正常对照组; B: 糖尿病模型组; C: 基因治疗拮抗组。

图 3 胰岛内胰岛素分泌的变化 (×100)

3 讨论

hGLP-1 是一种肠促胰岛素激素, 进食时小肠上段受到营养物质的刺激, 其下段的 L 细胞便会分泌出这种肽类激素。它能有效降低机体血糖水平, 是目前能诱导胰岛素分泌的最强物质之一。但由于丝氨酸蛋白酶-二肽酰基肽酶 IV (DPP IV) 的降解, 其在体内的半寿期明显缩短^[7]。为了提高其降糖效果,

延长半寿期,基于抵抗 DPP IV 的 hGLP-1 类似物已陆续推向市场,但重复多次的给药方式使肽类药物在临床的应用受到限制,而基因治疗作为一种新的治疗策略,可以将外源基因转入体内,使目的蛋白持续性得以表达,因此,基因治疗在糖尿病治疗中已显示出巨大前景^[8-10]。为此,作者在对 hGLP-1 基因修饰的基础上构建了含类似物基因的重组表达质粒,通过阳离子脂质体介导将质粒转染到大鼠体内,观察其对 STZ 诱导糖尿病大鼠的拮抗作用。在基因治疗过程中,可选择腺病毒载体、腺相关病毒载体、脂质体介导等方法将外源目的基因转入体内。本研究选用经典的基因转染方法——脂质体介导,用阳离子脂质体 Lipofectamine 包裹外源 hGLP-1 类似物基因,通过尾静脉注射导入体内。hGLP-1 类似物基因可能通过内吞、凝集等机制,随血流进入到肝脏、肌肉组织等细胞中表达。相对于病毒载体介导外源基因的转染方法,脂质体转染安全简便^[11],但转移效率较低是其缺陷,因此,在后续实验中要对如何提高基因转染效率、增强目的蛋白的靶向性等问题进行探索。

本实验在用 STZ 处理大鼠前 7 d,通过尾静脉注射将重组表达质粒导入体内,并于第 10 天加强注射 1 次,而 STZ 则采用小剂量、多次给药的方式,分别于第 7、8、9、10、11 天将 STZ 腹腔注射入大鼠体内,给予 hGLP-1 类似物基因治疗后,研究发现,在肌肉、肝脏及肾脏组织中观察到了绿色荧光蛋白 GFP 的表达,说明载体已成功转移至大鼠体内。研究结果提示,hGLP-1 类似物基因治疗对 STZ 诱导大鼠糖尿病形成有拮抗作用,糖尿病发病率降低,大鼠血糖水平下降,血清胰岛素水平升高,同时血清胆固醇水平也得以改善。也有研究显示,hGLP-1 可促进胰岛 β 细胞的增殖、减少 β 细胞的凋亡,对 β 细胞的功能恢复有一定的作用。本研究结果也显示,基因治疗拮抗组大鼠胰岛中胰岛素分泌颗粒明显增加,胰岛 β 细胞的功能改善。

本实验采用 pIRES2-EGFP 真核载体,可使表达的 hGLP-1 类似物不与 GFP 融合,保证了其构象与生理活性。借助荧光显微镜检测到 GFP,初步证明 hGLP-1 类似物基因已成功转入糖尿病大鼠体内并得到表达。总之,本研究采用阳离子脂质体作为载体,将重组质粒导入大鼠体内取得了较好的糖尿病拮抗作用,有望成为糖尿病基因治疗的一种方法。

参考文献:

- [1] 徐灵莉,刘晓玲,吴静,等. 2 型糖尿病患者健康教育方法的探讨[J]. 重庆医学,2008,37(8):865.
- [2] Edholm T,Cejvan K,Abdel-Halim SM,et al. The incretin hormones GIP and GLP-1 in diabetic rats: effects on insulin secretion and small bowel motility[J]. Neurogastroenterol Motil,2009,21(3):313.
- [3] Kumar M,Hunag Y,Glinka Y,et al. Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice [J]. Gene Ther,2007,14(2):162.
- [4] 李晓丽,刘振,张志珍. 人胰高血糖素样肽-1 类似物基因克隆及真核表达载体构建[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(3):259.
- [5] 吴凤丽,潘兴瑜,马晓光. 链尿佐菌素诱导 1 型糖尿病的发生机制[J]. 中国实验诊断学,2008,12(9):1096.
- [6] 张志珍,毛积芳,杨生生. 重组人胰高血糖素样肽-1 对实验性糖尿病大鼠血糖的影响[J]. 中国生化药物杂志,2004,25(5):287.
- [7] Salvatore T,Carbonara O,Cozzolino D,et al. Progress in the oral treatment of type 2 diabetes: update on DPP-IV inhibitors[J]. Curr Diabetes Rev,2009,5(2):92.
- [8] Green BD,Lavery KS,Irwin N,et al. Novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog (Val8) GLP-1 results in significant improvements of glucose tolerance and pancreatic β -cell function after 3-week daily administration in obese diabetic (ob/ob) mice[J]. J Pharmacol Exp Ther,2006,318(2):914.
- [9] Lee YS,Shin S,Shigihara T,et al. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis [J]. Diabetes,2007,56:1671.
- [10] Soltani N,Kumar M,Glinka Y,et al. In vivo expression of GLP-1/IgG-Fc fusion protein enhances beta-cell mass and protects against streptozotocin-induced diabetes[J]. Gene Ther,2007,14:981.
- [11] 左云龙,吴丽娟,匡风梧,等. 脂质体包裹 mA20 及其突变体质粒转染对内毒素血症小鼠的治疗作用[J]. 重庆医学,2008,37(13):1434.

(收稿日期:2009-09-27 修回日期:2009-12-20)

(上接第 1638 页)

- [3] 余波,罗锐,闵莉芳. 颌骨骨折 208 例临床分析[J]. 重庆医学,2004,33(10):1554.
- [4] 袁奎封. 坚固内固定治疗下颌骨骨折的利弊分析[J]. 现代口腔医学杂志,1998,12(1):75.
- [5] 段瑞,李永生,张晓林. 坚固内固定术后颌间牵引对颌骨骨折复位效果影响的临床研究[J]. 临床口腔医学杂志,2003,19(2):98.

- [6] 吴亚东,张伟,于子莹,等. 下颌骨骨折坚固内固定有限元分析[J]. 现代口腔医学杂志,2006,20(2):175.
- [7] 常祥安. 应用微型钛板治疗颜面部骨折[J]. 海南医学,2006,17(11):56.
- [8] 李雪冰. 微型钛板治疗下颌骨骨折疗效分析[J]. 医药论坛杂志,2007,28(19):66.

(收稿日期:2009-12-08 修回日期:2010-03-17)