

雌激素对 CETP 转基因小鼠糖代谢及胰岛功能影响的初步研究

符金香,朱晓慧,高贝贝,付真真,郭雯,周红文*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察 CETP 转基因小鼠在卵巢切除和雌激素替代情况下糖耐量和胰岛功能的改变。**方法:**15 只雌性 CETP 转基因小鼠随机分为 3 组,假手术组、卵巢切除组和雌激素替代组。除假手术组外,其余均行卵巢切除术。术后第 2 周开始,雌激素替代组给予雌激素治疗,而假手术组和卵巢切除组则给予同等剂量的橄榄油,4 周后检测各组小鼠空腹血糖,8 周后进行腹腔注射葡萄糖耐量(IPGTT)试验,提取小鼠胰岛做葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)实验。**结果:**术后 8 周,卵巢切除组小鼠空腹血糖较假手术组鼠明显升高($P < 0.05$),IPGTT 各时点血糖均较假手术组小鼠明显升高($P < 0.05$),GSIS 显示胰岛素分泌功能有减退的趋势;而雌激素替代组上述变化有明显改善,IPGTT 的 0、15、30 min 的血糖水平显著下降($P < 0.05$),GSIS 的胰岛素分泌功能也有改善的趋势。**结论:**CETP 转基因小鼠卵巢切除后胰岛功能下降,表现为空腹血糖升高、糖耐量受损、葡萄糖刺激的胰岛素分泌水平下降。雌激素替代能够对卵巢切除所带来的对于胰岛 β 细胞的有害影响起到一定的保护作用。

[关键词] 胆固醇酯转运蛋白;雌激素;卵巢切除术;绝经

[中图分类号] Q257

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1025-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140805

The effect of estrogen on glucose metabolism and islet function in CETP transgenic mice

Fu Jinxiang, Zhu Xiaohui, Gao Beibei, Fu Zhenzhen, Guo Wen, Zhou Hongwen*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To observe changes of glucose tolerance and insulin function of CETP transgenic mice with ovariectomy and estrogen replacement. **Methods:**Fifteen female CETP transgenic mice were randomly divided into three groups,including the sham group,the ovariectomy group and the estrogen replacement therapy group. The ovariectomy group and the estrogen replacement therapy group were underwent ovariectomy. Two weeks after operation,the estrogen replacement therapy group was given estrogen, while the sham group and the ovariectomy group were given equal dosages of olive oil. Fasting glucose was measured four weeks after operation. Islets were extracted to test islet function by intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)and GSIS eight weeks after operation. **Results:**Mice of the ovariectomy group showed significantly increased fasting glucose levels 8 weeks after operation compared with those of the sham group ($P < 0.05$). The blood glucose of mice at all time points of IPGTT increased significantly than those in the sham group ($P < 0.05$). GSIS showed that insulin secretion had a decreased tendency. While after ovariectomy,estrogen replacement therapy significantly improved the above changes. Blood glucose levels at 0,15 and 30 min of IPGTT were decreased significantly ($P < 0.05$). Insulin secretion function of GSIS also had an improved tendency. **Conclusion:**After ovariectomy,CETP transgenic mice have impaired islet function and glucose tolerance,which lead to the increase of fasting blood glucose and the decrease of glucose stimulated insulin secretion levels. Estrogen replacement plays a protective role in the harmful effects of ovariectomy on pancreatic islet β cells.

[Key words] cholesteryl ester transfer protein;estrogen;ovariectomy;menopause

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(08):1025-1028]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81170747),江苏省六大人才高峰(2008-18D)

*通信作者 (Corresponding author),E-mail:drhongwenzhou@163.com

众所周知,心血管并发症是 2 型糖尿病的主要致死原因。研究证明心血管疾病的发病与高胰岛素血症、胰岛素敏感性下降等因素密切相关。绝经期妇女由于体内雌激素水平改变,造成 2 型糖尿病及心血管疾病发病率升高。因此,雌激素对胰岛功能影响

的研究对于2型糖尿病及其心血管并发症的预防有着重要的意义。

胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)作为胆固醇逆向转运过程中的关键蛋白,参与了高密度脂蛋白(HDL)代谢,与2型糖尿病和肥胖密切相关。流行病学研究显示,2型糖尿病和肥胖患者的血清CETP活性和浓度都显著高于对照组。但CETP基因作为影响胰岛功能的因素,仅在人和豚鼠高表达。C57BL/6J小鼠先天无CETP表达,而SD大鼠的血浆CETP活性很低。因此,本研究采用CETP转基因小鼠,该小鼠很好地模拟了人体CETP表达的分布^[1],多个组织均能表达CETP,其运用可以更好地研究雌激素对于胰岛功能的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠模型的建立和分组:12周龄健康雌性CETP转基因小鼠15只,由纽约州立大学下州医学中心的Dr. Jiang's Lab赠送并引进,随机分为3组,假手术组、卵巢切除组、卵巢切除+雌激素替代组(简称雌激素替代组),每组各5只。用1%苯巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,对假手术组小鼠行皮肤切开,双侧卵巢周围脂肪切除,卵巢切除组和雌激素替代组行双侧卵巢切除手术。雌激素替代组术后第2天予以腹腔注射苯甲酸雌二醇0.2 mg/kg,每周2次,假手术组和卵巢切除组予以腹腔注射同等量的橄榄油。

血清胰岛素测定试剂盒购于北方生物技术研究所,胶原酶V购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠腹腔注射葡萄糖耐量实验(IPGTT)

小鼠手术后8周,禁食16 h过夜,腹腔注射葡萄糖(1 g/kg),在0、15、30、60、120 min分别测小鼠尾血中葡萄糖浓度。

1.2.2 小鼠胰岛分离

小鼠称重,水合氯醛麻醉,打开腹腔,夹闭十二指肠开口。向胆总管注入胶原酶V,分离胰腺组织后消化,之后再行筛网过滤清洗,体式镜下挑取胰岛并计数。1640培养液孵育过夜,第2天用于实验。

1.2.3 葡萄糖刺激的胰岛素分泌实验(GSIS)

各组挑取前1 d分离的5个胰岛,用低糖和高糖培养液刺激胰岛后,采用放免法检测上清中胰岛素的含量。

1.2.4 放免法检测上清胰岛素

取圆底聚苯乙烯试管若干,用记号笔编号总T管、NSB、S0-S5、质控管和待测样品管。按照试剂盒说明书用微量加样器加入质控或样品、¹²⁵I-Ins、Ins抗体等,混匀后37℃温育,再加入驴抗豚免疫分离剂充分摇匀,室温放置后离心15 min,弃去上清,检测各沉淀管的放射性计数,然后根据标准曲线检测样品的值。

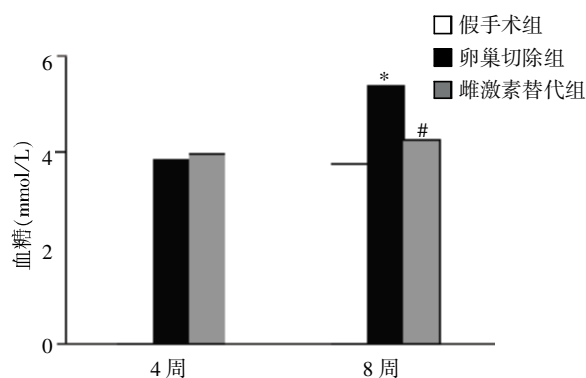
1.3 统计学方法

应用SPSS11.0统计软件对数据进行统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据比较应用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后4周和8周空腹血糖比较

术后4周各组小鼠的空腹血糖之间没有明显差别;术后8周,卵巢切除小鼠的空腹血糖为(5.4 ± 0.8) mmol/L,较假手术组鼠[(3.7 ± 0.9) mmol/L]明显升高($P = 0.019$,图1),而雌激素替代组小鼠的空腹血糖[(4.3 ± 0.5) mmol/L]与卵巢切除组小鼠相比有明显的改善($P = 0.043$,图1),而与假手术组没有明显差别($P = 0.276$)。



与同周龄假手术组比较,* $P < 0.05$;与同周龄卵巢切除组比较,# $P < 0.05$ 。

图1 各组小鼠手术后空腹血糖比较

Figure 1 Comparison of fasting blood glucose levels of mice in each group after operation

2.2 术后8周IPGTT血糖比较

术后8周卵巢切除组小鼠IPGTT各时点血糖均较假手术组小鼠明显升高($P < 0.05$,表1),而雌激素替代组小鼠0、15和30 min的血糖有了明显改善, P 值分别为0.026、0.034、0.036,并且这3个时点的血糖与假手术组相比没有统计学差异。

2.3 术后 8 周 GSIS 结果比较

术后 8 周分离小鼠的胰岛做 GSIS, 结果显示, 卵巢切除组小鼠高糖与低糖刺激下胰岛素量的比值 (5.07) 较假手术组小鼠的胰岛素分泌功能 (6.64) 有

减退的趋势 ($P = 0.421$); 而雌激素替代 (6.24) 则对上述变化起到一定的改善作用 ($P = 0.748$), GSIS 的胰岛素分泌功能有上升的趋势, 但差异无统计学意义 (图 2)。

表 1 各组小鼠 IPGTT 血糖比较

Table 1 Comparison of blood glucose levels in IPGTT of mice in each group ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

分组	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
假手术组	3.7 ± 0.9	9.3 ± 0.8	7.8 ± 1.1	6.0 ± 1.3	4.4 ± 0.8
卵巢切除组	5.4 ± 0.8*	11.9 ± 2.2*	9.8 ± 1.4*	7.2 ± 0.7*	5.5 ± 0.7*
雌激素替代组	4.3 ± 0.5#	9.6 ± 1.6#	8.7 ± 1.7#	6.7 ± 0.9	5.3 ± 1.0

与假手术组比较 * $P < 0.05$; 与卵巢切除组比较, # $P < 0.05$ 。

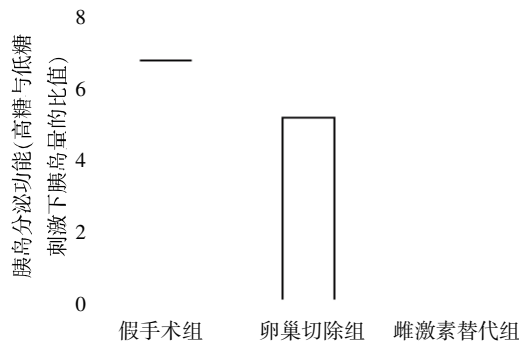


图 2 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)实验结果

Figure 2 The result of glucose stimulated insulin secretion

3 讨论

CETP 的作用^[1]主要是促进胆固醇酯(CE)从 HDL 向低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)的转移, 并使甘油三酯(TG)从 LDL 和 VLDL 转向 HDL。另外, CETP 也是胆固醇逆向转运中的关键蛋白质, 它能使得周围组织的游离胆固醇(FC)与 HDL 结合并酯化后, 经 CETP 转移给 LDL 和 VLDL, 再被肝脏的 LDL 及 VLDL 受体摄入入肝细胞进行代谢。CETP 的上述作用导致其与动脉粥样硬化关系密切。本研究小组将人 CETP 基因转入 3T3-L1 脂肪前体细胞, 发现人 CETP 能够升高 3T3-L1 脂肪细胞的胆固醇水平、增加胰岛素刺激的 Akt 磷酸化以及葡萄糖摄取, 因此本研究认为 CETP 除了介导脂蛋白代谢外, 还可以影响 3T3-L1 脂肪细胞的糖代谢和胰岛素的作用^[2]。此外, 研究证实 CETP 抑制剂的使用可能通过提高餐后胰岛素水平, 改善葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 这一作用可能是通过增加 β 细胞胆固醇外流实现^[3], CETP 抑制剂还有增加胰岛素分泌的作用^[4]。

雌激素在生物体生长发育代谢的过程中均发挥重要作用。比如, 绝经后雌激素水平的降低可以引起骨质疏松, 补充雌激素之后, 骨吸收和骨形成都可恢复到绝经前状态, 因而激素补充治疗能从病因上来预防绝经后骨质疏松。此外, 雌激素与 2 型糖尿病及肥胖的关系也非常密切。2 型糖尿病的发病率在绝经后较绝经前明显上升^[5]。Borissova 等^[6]在 2 型糖尿病患者群中发现, 绝经后患者予以激素替代治疗后观察到雌激素能够促进第一时向和第二时向的胰岛素分泌, 并且高胰岛素正葡萄糖钳夹试验证明其胰岛素抵抗也得到了改善, 高胰岛素血症得到了纠正。Campbell 等^[7]发现, 雌性 SD 大鼠卵巢切除后肌肉的葡萄糖摄取率减少, 给予其雌激素替代之后葡萄糖摄取率恢复正常。因此, 雌激素对胰岛功能的研究对 2 型糖尿病和肥胖以及相关的心血管并发症意义重大。

Martinez 等^[8]采用高葡萄糖钳夹评估 CETP 转基因小鼠胰岛功能, 发现高脂饮食使糖耐量受损, 而卵巢切除后 CETP 转基因小鼠的糖耐量受损加重。本研究结果证实, 术后 4 周雌激素缺乏小鼠的空腹血糖尚未出现明显异常, 可能与雌激素缺乏的时间较短有关。术后 8 周雌激素缺乏导致糖耐量受损、葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能减退, 而雌激素替代可以部分改善上述雌激素缺乏带来的不良影响, 表明雌激素对于胰岛功能缺失有保护作用, 这一结果与之前的文献基本一致。对于雌激素替代治疗改善作用不是很显著的问题, 考虑到本研究采用的是便于操作的腹腔注射苯甲酸雌二醇, 并且是每周 2 次, 由于腹腔注射的吸收问题以及注射次数等原因, 因此无法完全模拟正常的生理性雌激素水平。

本研究的优势在于, 考虑到 CETP 对胰岛功能的影响, 创新采用 CETP 转基因小鼠作为雌激素对胰岛功能影响研究的对象。目前, 对于绝经后妇女的

糖尿病发生率增加的原因尚未阐明,这一模型的建立将有利于进一步研究雌激素对胰岛 β 细胞功能的影响、对2型糖尿病的作用,有利于深入探讨其可能的机制。本研究证实,雌激素缺乏确实可以使糖耐量受损、胰岛功能减退,雌激素的替代治疗对其有改善作用。因此,雌激素对绝经后女性的胰岛功能具有保护作用,其机制有待进一步研究。目前已证明激素替代治疗能预防绝经后骨质疏松,但长期使用会导致多种严重不良反应,特别是增加乳腺癌^[9]和子宫内膜癌^[10]的风险,多年来运用激素替代来治疗绝经后女性骨质疏松这一方法仍然备受争议。因此,虽然雌激素能够在一定程度上保护绝经后胰岛功能,但鉴于长期使用存在的不良反应,可考虑从雌激素受体调节剂等其他方面对胰岛功能受损患者进行适当的干预。

[参考文献]

- [1] Zhou H, Li Z, Silver DL, et al. Cholesteryl ester transfer protein(CETP)expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761 (12): 1482-1488
- [2] Ju X, Cui Q, Zhang M, et al. Human cholesteryl ester transfer protein enhances insulin-mediated glucose uptake in adipocytes[J]. *Life Sci*, 2011, 89(13-14): 479-484
- [3] Siebel AL, Natoli AK, Yap FY. Effects of high-density lipoprotein elevation with cholesteryl ester transfer protein inhibition on insulin secretion [J]. *Circ Res*, 2013, 113 (2): 167-175
- [4] Fazio S, Linton MF. Killing two birds with one stone, maybe: CETP inhibition increases both high-density lipoprotein levels and insulin secretion [J]. *Circ Res*, 2013, 113(2): 94-96
- [5] Godsland RF. Oestrogens and insulin secretion [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(11): 2213-2220
- [6] Borissova AM, Tankova T, Kamenova P. Effect of hormone replacement therapy on insulin secretion and insulin sensitivity in postmenopausal diabetic women [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2002, 16(1): 67-74
- [7] Campbell SE, Febbraio MA. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(5): E1139-E1146
- [8] Martinez MN, Emfinger CH, Overton M, et al. Obesity and altered glucose metabolism impact HDL composition in CETP transgenic mice: a role for ovarian hormones [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(3): 379-389
- [9] Key T, Appleby P, Barnes I, et al. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: re-analysis of nine prospective studies [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(8): 606-616
- [10] Sturdee DW, Ulrich LG, Barlow DH, et al. The endometrial response to sequential and continuous combined oestrogen-progestogen replacement therapy [J]. *BJOG*, 2000, 107 (11): 1392-1400

[收稿日期] 2014-02-24