

成纤维细胞生长因子 21 对 1 型糖尿病动物模型的肝糖代谢影响及机制研究*

孙国鹏¹⁾ 叶贤龙²⁾ 任桂萍²⁾ 李晋南²⁾ 李德山^{2)**}

(¹⁾新乡学院生命科学与技术系, 新乡 453000; ²⁾东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 成纤维细胞生长因子(FGF)-21 是 FGF 家族的成员之一。作为近年发现的一种新的糖代谢调节因子, 大量研究表明, FGF-21 是一种不依赖胰岛素, 能够独立降糖的 2 型糖尿病治疗潜力型药物。但是, 能否应用于 1 型糖尿病的治疗, 国内外目前尚无报道。通过改良传统造模方法, 诱导小鼠缓慢产生糖耐量异常, 研究 FGF-21 对此类模型的糖代谢影响及肝糖代谢机制。通过检测 FGF-21 短期注射和长期注射后模型动物血糖的变化, 研究 FGF-21 在模型动物上对血糖的调控效果。采用实时定量 PCR 检测 FGF-21 对模型动物肝脏中葡萄糖转运蛋白(GLUT)1、4 mRNA 的表达影响。利用蒽酮法检测模型动物肝脏中糖原合成量。实验结果显示, FGF-21 能够调节 1 型糖尿病动物的血糖水平, 并呈剂量依赖性。同时, 首次在 1 型糖尿病动物模型上证实了低剂量 FGF-21(0.125 mg/kg)与胰岛素的协同作用效果优于相同剂量 FGF-21 和胰岛素单独注射的效果。治疗结果表明, FGF-21 能够维持 1 型糖尿病动物模型血糖在正常范围, 效果优于胰岛素。实时定量 PCR 结果发现, 与胰岛素上调 GLUT4 mRNA 表达量不同的是, FGF-21 作用动物模型 8 周后, GLUT1 mRNA 表达量显著提高, 长期的 FGF-21 与胰岛素协同注射使 GLUT1、4 mRNA 表达量同时显著提高。长期 FGF-21 与胰岛素协同注射组和高剂量 FGF-21 注射均可显著提高模型动物肝糖原的合成。结果表明, FGF-21 促进动物模型糖代谢机制与增加 GLUT1 表达、增加糖原合成作用有关。为临床应用 FGF-21 治疗 1 型糖尿病, 增加胰岛素敏感性提供了理论依据。

关键词 成纤维细胞生长因子 21, 迟发性 1 型糖尿病动物模型, 糖代谢, 胰岛素协同作用, 糖尿病治疗药物

学科分类号 Q7, R587.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00098

糖尿病是一类由多种病因引起的代谢类疾病。该病以高血糖为主要特征, 并伴随多饮、多尿、多食以及消瘦等症状。糖尿病发展下去, 持续的高血糖会损害心脏、血管、眼睛、肾脏和神经等组织和器官, 引起一系列并发症最终导致死亡。糖尿病的临床治疗一直需要一种能不以胰岛素为依托, 解决胰岛素抵抗的新型药物^[1]。成纤维细胞生长因子-21 (fibroblast growth factor-21, FGF-21)是最近发现的 FGF 家族中的一员, 主要在肝脏中表达。已发表的数据证明, 它可以有效降低 2 型糖尿病动物胰岛素水平, 改善胰岛素抵抗, 而且大剂量用药也不会导致低血糖的发生及细胞增殖^[2], 并且不会产生高胰岛素血症、体重增加和水肿等常规降糖药物所带来的副作用。因此, FGF-21 具有成为治疗糖尿病新型药物的潜力。

目前 FGF-21 的研究已成为世界糖尿病研究的

新热点。近年来, 不断有文献报道 FGF-21 的生物学功能, 其功能的涉及面也越来越广。大量研究结果表明, FGF-21 是一种治疗 2 型糖尿病的潜力型药物, 但针对 1 型糖尿病血糖调节机制的研究尚无报道。已有研究表明 FGF-21 能够改善胰腺功能, 促进胰岛细胞再生^[3]。刘铭瑶等^[4]进一步研究表明, FGF-21 能够促进 HepG2 肝细胞系的葡萄糖吸收, 因此本研究在动物水平对 FGF-21 治疗后的模型肝糖代谢进行研究。针对 FGF-21 对糖代谢的调节作用, 通过改良传统链脲佐菌素(STZ)诱导模型方法,

* 黑龙江省科技厅攻关项目资助(2006G0461-00)和哈尔滨市科技创新人才发展计划资助项目(2006RFXXS002)。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@126.com

收稿日期: 2011-03-02, 接受日期: 2011-05-04

建立能够模拟糖尿病病发过程的迟发性 1 型糖尿病动物模型, 并应用此模型首次对 FGF-21 在 1 型糖尿病动物上的糖代谢影响及其肝糖代谢机制进行初步研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂. 链脲佐菌素为 Sigma 公司产品(批号 1000543148); 小鼠血清胰岛素 ELISA 试剂盒为美国 ADL 公司产品; 小鼠糖基化血红蛋白 A1c(GHbA1c)酶联免疫试剂盒为美国 UCL 公司产品; 兔抗鼠 FGF-21 多克隆抗体由东北农业大学生物制药教研室制备, 经标准蛋白验证; HRP 标记的二抗为羊抗兔抗体购自 R&D 公司; 其他化学试剂为分析纯为国药集团化学试剂有限公司产品.

1.1.2 实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成.

1.1.3 动物. 健康成年昆明小鼠, 雄性, 普通级, 购于哈尔滨兽医研究所.

1.2 实验方法

1.2.1 迟发性 1 型糖尿病动物模型制备. 小鼠适应性饲喂 2 周后其体重达到 40~50g, 准备开始实验. 实验开始前, 需将小鼠禁食不禁水 12 h. 第一次按 20mg/kg 剂量, 腹腔注射 STZ, 间隔 3 日按 15 mg/kg 剂量, 腹腔第二次注射 STZ; 对照组只注射柠檬酸-柠檬酸钠(pH 4.4)缓冲液. 注射 4 周后, 选取空腹血糖浓度 > 16.65 mmol/L, 且糖基化血红蛋白水平 > 6.2% 的模型小鼠进行实验. 实验过程中动物自由进食、饮水.

1.2.2 鼠源 FGF-21(mFGF-21)蛋白的制备. 将表达 SUMO-mFGF-21 的 Rosetta 菌液上清通过上样器注入 AKTApurifier 100 系统, 流速为 1 ml/min; 样品与 HisTrap™ FF crude column 完全结合后, 用 10~15 倍柱体积的含 40 mmol/L 咪唑的结合缓冲液冲洗去除杂蛋白; 当紫外吸收曲线达到稳定的基线时, 再用至少 5 倍柱体积含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液将融合蛋白洗脱下来; 当紫外吸收曲线上出现相应蛋白吸收峰时, 收集洗脱液. 采用 HiPrep™ 26/10 脱盐柱将高浓度咪唑保存液置换为磷酸盐缓冲液, 然后使用 SUMO 蛋白酶切除融合标签. 酶切产物通过 HisTrap™ FF crude column 亲和层析分离纯化, 利用收集器收集 mFGF-21 成熟蛋白. 通过 HPLC Biosuit™250 硅胶柱分析 mFGF-21 纯度并使用萤试剂检测蛋白质内毒素含量.

1.2.3 Western blotting 检测 mFGF-21. 用兔抗鼠 FGF-21 多克隆抗体(按 1:100 比例稀释)与辣根过氧化物酶标记的(HRP)二抗(按 1:5 000 比例稀释)进行 Western blotting 检测.

1.2.4 mFGF-21 调节模型动物糖代谢研究. 将模型小鼠随机分为 7 组, 每组 5 只. 通过皮下给药方式, 阴性对照组注射生理盐水, 阳性对照组注射 4U 人重组胰岛素, 设置不同 mFGF-21 蛋白剂量组, 研究其最低有效剂量及持续时间. A 组按 0.125 mg/kg 体重比注射 mFGF-21, B 组按 0.25 mg/kg 体重比注射 mFGF-21, C 组按 0.5 mg/kg 体重比注射 mFGF-21, D 组按 0.75 mg/kg 体重比注射 mFGF-21, 为研究其与胰岛素在动物模型上的作用关系, 设置 E 组, 混合注射 4U 胰岛素与 0.125 mg/kg mFGF-21. 连续注射 8 周, 观察各个处理组的血糖以及糖基化血红蛋白变化情况.

1.2.5 mFGF-21 对模型动物肝脏中葡萄糖转运蛋白(GLUT) 1、4mRNA 的表达影响. 糖尿病模型动物分别注射 0.75mg/kg mFGF-21、4U 胰岛素、4U 胰岛素和 0.125 mg/kg mFGF-21, 注射生理盐水模型鼠为对照. 注射 8 周后, 断颈处死后用 Trizol 法提取肝脏总 RNA. 以不同处理的肝脏总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₅ 为引物合成 cDNA. 利用实时荧光定量 PCR 方法检测模型动物肝脏内 GLUT1、4 mRNA 的表达变化. 选用在肝脏组织中稳定表达的 β -actin 作为内参. 按照 Thermal Cycler Dice™ Real Time PCR (TaKaRa Code: TP800) 的使用说明书要求进行实验操作, 同时扩增内参及 GLUT1、4 目的基因. β -actin 内参上游引物为 5' GAGACCT-TCAACCCC 3', 下游引物为 5' GTGGTGGTGAA-GCTGTAGCC 3'. GLUT1 目的基因扩增上游引物为 5' CCATCCACCACACTCACCAC 3', 下游引物为 5' GCCCAGGATCAGCATCTCAA 3'. GLUT4 目的基因扩增上游引物为 5' CTTCTTTGAGATTG-GCCCTGG 3', 下游引物为 5' AGGTGAAGATG-AAGAAGCCAAGC 3', 每个样品至少重复 3 次. 使用相对定量分析方法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)对目的基因进行相对定量.

1.2.6 模型动物肝糖原检测(蒽酮法)方法见文献[5].

1.2.7 统计分析. 应用 SPSS11.1 统计分析软件对结果进行处理. 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 两组间比较用 t 检验.

2 结 果

2.1 1 型糖尿病动物模型空腹血糖、糖基化血红蛋白、血清胰岛素

注射 STZ 两周后, 模型组空腹血糖与对照组

比较, 差异极显著(** $P < 0.01$); 糖基化血红蛋白与对照组比较, 差异显著(* $P < 0.05$); 血清胰岛素水平与对照组比较, 差异显著(* $P < 0.05$). 这些结果表明建模成功, 结果见表 1.

Table 1 The fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin and serum insulin level of the model mice

Group	$c(\text{Glu})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	GHbA1c/%	$\rho(\text{Serum insulin})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
Control	4.61 ± 0.36	4.33 ± 0.28	0.35 ± 0.04
Model set	$16.22 \pm 1.14^{**}$	$8.41 \pm 0.37^{*}$	$0.24 \pm 0.04^{*}$

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 5 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

2.2 mFGF-21 蛋白的制备

将菌液上清通过上样器注入 AKTApurifier 100 系统, 使样品与 HisTrap™ FF crude column 完全结合, 融合蛋白在 500 mmol/L 浓度咪唑作用下与镍柱脱离, 紫外光吸收为单一对称峰, 结果见图 1. 融合蛋白经脱盐柱后, 将高浓度咪唑溶液置换成磷酸盐缓冲液, 结果见图 2. 所得成熟 mFGF-21 经 HPLC 分析, 在 14 min 处有纯度较高的单一对称峰出现, 认为是 mFGF-21 成熟蛋白, 其纯度可达到 95%以上, 结果见图 3. 蛋白质经鲎试剂检测分析, 其内毒素含量为(0.63 ± 0.14) EU/ml, 符合动物实验标准. 图 4 为 SUMO-mFGF-21 融合蛋白、SUMO-mFGF-21 融合蛋白酶切产物与成熟 mFGF-21 的 SDS-PAGE 分析结果.

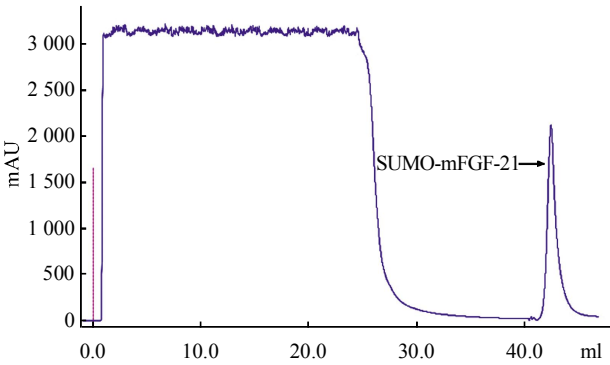


Fig. 1 Affinity chromatogram of SUMO-mFGF21 by HisTrap™ FF crude

— : Manual run 9:10 UV1 280 nm; — : Manual run 9:10 inject.

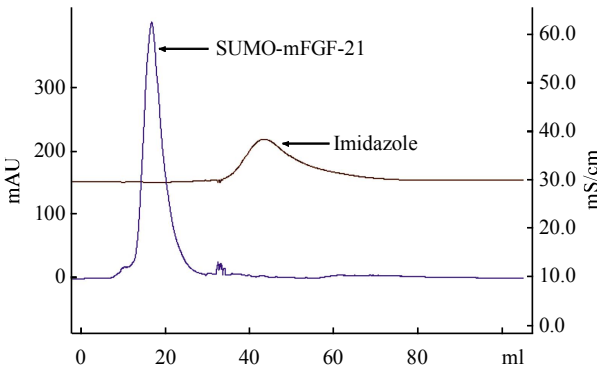


Fig. 2 Gel chromatography of SUMO-mFGF-21 by HiPrep™ 26/10 desalting

— : Manual run 8:10 UV1 280 nm; — : Manual run 8:10 cond.

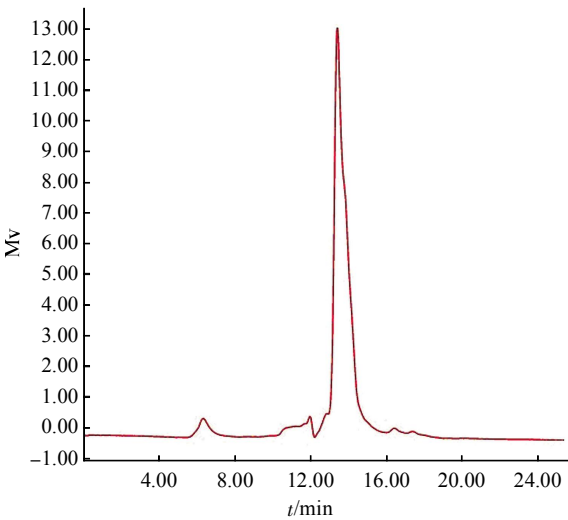


Fig. 3 Analysis mFGF-21 by HPLC

— : Sample lijinnan.(3)2008.08.05; Injection 10; Satin Ch 1; Date: 2008-8-5 21:41:16 CST.

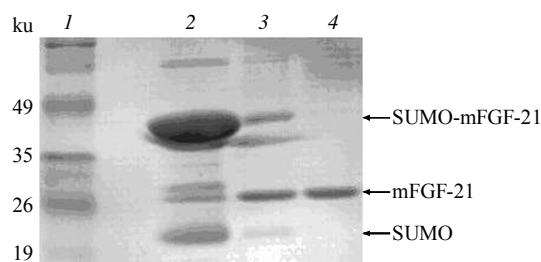


Fig. 4 SDS-PAGE gel analysis of purification of mFGF-21
1: Marker; 2: SUMO-mFGF-21 fusion protein; 3: Digestion products of SUMO-mFGF-21; 4: mFGF-21 protein.

2.3 mFGF-21 Western blotting 检测

蛋白质印迹实验中 1 号泳道加入 1 μ g mFGF-21 蛋白作为待检物, 2 号泳道加入 1 μ g BSA 作为阴性对照. 用兔抗鼠 mFGF-21 多抗进行 Western blotting 检测的结果分析表明, 1 号泳道的蛋白质能与兔抗鼠 mFGF-21 抗体发生反应. 证明 mFGF-21 反应的特异性(图 5).

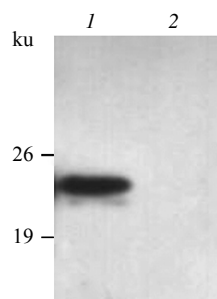


Fig. 5 Western blotting analysis of mFGF-21
1: mFGF-21; 2: BSA.

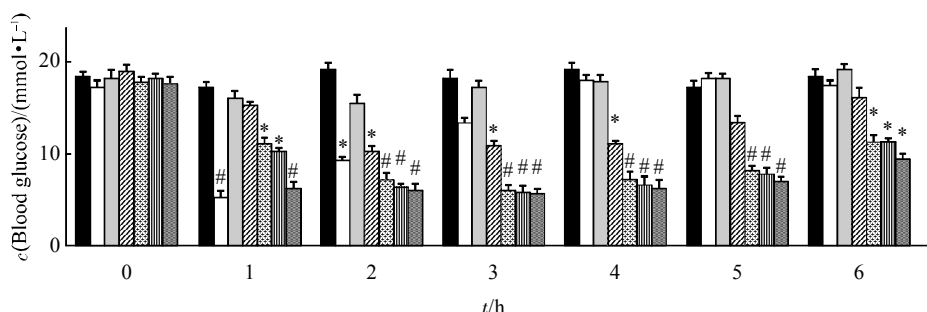


Fig. 6 6 hours blood glucose of different groups

The animal model mice were administrated with saline(Control), 4U insulin, 0.125 mg/kg mFGF-21, 0.25 mg/kg mFGF-21, 0.5 mg/kg mFGF-21, 0.75 mg/kg mFGF-21, 4U insulin plus 0.125 mg/kg mFGF-21 co-treatment respectively for 6 h. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 5 independent measurements. * $P < 0.05$, # $P < 0.001$ compared with each group before treatment. ■: Control(saline); □: 4U insulin; ▨: 0.125 mg/kg; ▩: 0.25 mg/kg; ▪: 0.5 mg/kg; ▫: 0.75 mg/kg; ▬: 4U+0.125 mg/kg.

2.4 mFGF-21 调节模型动物糖代谢结果

2.4.1 mFGF-21 对 1 型糖尿病模型的短期降糖效果. 血糖的测定采用美国强生血糖仪及其配套试纸, 每间隔 1 h 检测血糖, 血糖检测过程中动物自由进食、饮水. 生理盐水对照组, 在注射前后血糖没有变化; 人重组胰岛素注射组, 在注射后 1 h 即降血糖至正常水平(5.43 ± 0.71) mmol/L, 注射后 2 h 血糖回升至(9.18 ± 0.56) mmol/L, 至第 4 h 已经完全回复至初始水平(17.91 ± 0.78) mmol/L; 0.125 mg/kg mFGF-21 处理组在注射后 1 h 略有下降(16.09 ± 0.83) mmol/L, 但不显著; 0.25 mg/kg mFGF-21 处理组在注射 2 h 后血糖降至(10.32 ± 0.66) mmol/L, 然后逐渐回复, 第 6 h 回复到初始水平; 0.5 mg/kg mFGF-21 处理组在注射 2 h 后血糖接近正常水平(7.33 ± 0.62) mmol/L, 并持续维持模型小鼠血糖处于正常水平近 5 h; 0.75 mg/kg mFGF-21 处理组与 0.5 mg/kg mFGF-21 处理组相同, 同样可维持模型小鼠血糖处于正常水平近 5 h, 证实 mFGF-21 在动物体内对血糖的调节呈剂量依赖性; 有趣的是 0.125 mg/kg mFGF-21 单独处理模型动物, 短期内注射无法维持模型小鼠血糖正常水平, 且常用的人重组胰岛素的作用时间只有 2 h 左右. 将 4U 重组人胰岛素与 0.125 mg/kg 的 mFGF-21 混合注射后, 无论是持续时间还是作用效果都明显优于每种组份单独给药的效果, 血糖在注射 1 h 后即可降至正常水平(6.33 ± 0.79) mmol/L, 并一直维持血糖正常水平达 6 h, 结果见图 6.

2.4.2 mFGF-21 对 1 型糖尿病模型的长期降糖效果. 每日 1 次注射胰岛素(4U insulin)、不同剂量的 FGF-21(A 组: 0.125 mg/kg mFGF-21; B 组: 0.25 mg/kg mFGF-21; C 组: 0.5 mg/kg mFGF-21; D 组: 0.75 mg/kg mFGF-21)和 FGF-21 与胰岛素混合剂量(E 组: 0.125 mg/kg mFGF-21+4U 胰岛素), 连续注射 8 周后停药. 停药 1 天后检测不同处理组, 正常饮食、饮水后的血糖和糖基化血红蛋白变化. 阴性对照组, 血糖与糖基化血红蛋白较 8 周前升高水平差异显著(** $P < 0.01$), 说明无治疗措施的情况下模型动物高血糖病症加重; 胰岛素处理组, 血糖与糖基化血红蛋白较 8 周前无明显变化, 说明胰岛素治疗组仅可在短时间内控制血糖水平, 无法对血糖

起到长期的调控效果, 糖基化血红蛋白水平没有降低; A 组血糖与糖基化血红蛋白较 8 周前均有降低且差异显著(* $P < 0.05$), 说明小剂量的 mFGF-21 对模型动物的高血糖症状有所缓解, 在一定程度上能长期控制血糖的水平, 糖基化血红蛋白较治疗之前有一定程度的降低; B 组、C 组、D 组和 E 组, 血糖与糖基化血红蛋白较 8 周前均有明显降低, 且差异极显著(** $P < 0.01$), 说明高剂量 mFGF-21 组(C 组和 D 组)与协同作用组对糖尿病动物的血糖水平有长久持续的调控作用, 反映 8~12 周血糖水平的糖基化血红蛋白较未经治疗前糖基化水平明显下降, 结果见表 2.

Table 2 The blood glucose level and glycosylated hemoglobin of the model mice after administration with different doses of mFGF-21 and insulin plus mFGF-21 for 8 weeks

Group	Before administration		8 weeks later	
	$c(\text{Glu})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	GHbA1c/%	$c(\text{Glu})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	GHbA1c/%
Control(salin)	18.58 $\pm$ 0.75	12.31 $\pm$ 0.95	24.19 $\pm$ 0.82**	19.72 $\pm$ 0.83**
Insulin	18.22 $\pm$ 1.63	13.44 $\pm$ 0.46	18.67 $\pm$ 1.32	14.32 $\pm$ 0.73
Group A	17.28 $\pm$ 1.02	12.49 $\pm$ 0.54	13.33 $\pm$ 0.85*	10.52 $\pm$ 0.67*
Group B	18.27 $\pm$ 0.78	14.73 $\pm$ 0.31	10.21 $\pm$ 0.52**	10.10 $\pm$ 0.73**
Group C	19.13 $\pm$ 0.81	13.08 $\pm$ 0.74	9.17 $\pm$ 0.71**	8.11 $\pm$ 0.62**
Group D	18.17 $\pm$ 0.69	12.32 $\pm$ 0.67	8.38 $\pm$ 0.57**	7.62 $\pm$ 0.67**
Group E	17.64 $\pm$ 0.93	12.11 $\pm$ 0.78	7.65 $\pm$ 0.46**	7.82 $\pm$ 0.81**

The model mice were administrated with saline(Control), 4U insulin(insulin), 0.125mg/kg mFGF-21 (Group A), 0.25 mg/kg mFGF-21 (Group B), 0.5 mg/kg mFGF-21 (Group C), 0.75 mg/kg mFGF-21 (Group D), 4U insulin plus 0.125 mg/kg mFGF-21 co-treatment(Group E) respectively for 8 weeks. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 5 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with each group before administration.

2.5 mFGF-21 影响模型动物肝脏内 GLUT1、4 mRNA 表达变化

糖尿病模型动物分别注射 4U 胰岛素、0.75 mg/kg mFGF-21、4U 胰岛素与 0.125 mg/kg mFGF-21, 对照组注射生理盐水, 8 周后, 提取肝脏总 RNA, 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用特异性引物进行 Real-time PCR 检测不同处理组间 GLUT1、4mRNA 的表达量变化, 以注射生理盐水的模型动物为对照, 结果见图 7. 经胰岛素长期注射后, GLUT4 mRNA 的表达量增加了 2.6 倍, 较对照组差异极显著($P < 0.01$), 而 GULT1mRNA 的表达量增至 1.13 倍, 较对照组无明显差异; 经 mFGF-21 长期注射后, GLUT1 mRNA 的表达量,

增加了 3.4 倍, 较对照组差异极显著($P < 0.01$), 而 GLUT4 mRNA 的表达量增加 1.22 倍, 较对照组相比无明显差异; 长期注射低剂量 FGF-21 与胰岛素后, GLUT1 mRNA 的表达量增加了 1.8 倍, 较对照组相比差异显著($P < 0.05$), GLUT4 mRNA 的表达量增加了 3.1 倍, 较对照组相比差异极显著($P < 0.01$). 由此可见, 与胰岛素促进 GLUT4 表达不同的是, mFGF-21 在动物模型中是通过上调 GLUT1 的表达来促进葡萄糖的摄取. 低剂量 mFGF-21 与胰岛素协同注射后则可通过同时上调 GLUT1、4 的表达来加强葡萄糖的摄取, 增加葡萄糖转运.

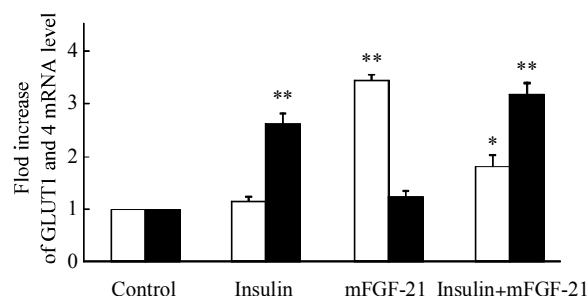


Fig. 7 GLUT1 and 4 mRNA expressions in the liver of T1DM mice model after administration with insulin, low-dose mFGF-21 plus insulin co-treatment, high-dose mFGF-21 respectively

The animal model mice were administrated with saline (Control), 4U insulin, 0.75 mg/kg mFGF-21, 4U insulin plus 0.125 mg/kg mFGF-21 co-treatment respectively for 8 weeks. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group administrated with saline. □: GLUT1 mRNA; ■: GLUT4 mRNA.

2.6 mFGF-21 对模型动物肝糖原的影响

注射 4U 胰岛素、4U 胰岛素 + 0.125 mg/kg mFGF-21 和 0.75 mg/kg mFGF-21 模型动物注射 8 周后停药, 采集肝脏组织, 经蒽酮法测定糖原含量(图 8)。结果表明, 3 种长期注射均可促进模型动物肝脏糖原的合成, 胰岛素注射组糖原含量 (19.05 ± 0.33) mg/g 与注射生理盐水的对照组

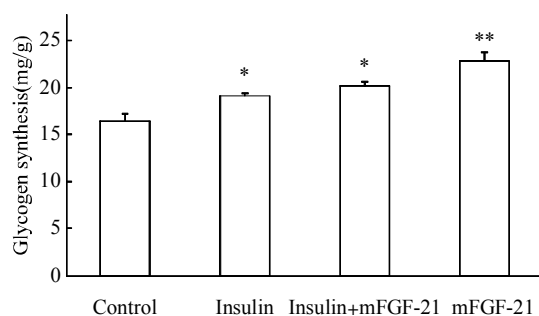


Fig. 8 The glycogen synthesis of model mice after administrated with insulin, low-dose mFGF-21 and insulin co-treatment, high-dose mFGF-21 respectively

The animal model mice were administrated with saline (Control), 4U insulin, 4U insulin plus 0.125 mg/kg mFGF-21 co-treatment, 0.75 mg/kg mFGF-21 respectively for 8 weeks. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 5 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

(16.43 ± 0.82) mg/g 比较, 差异显著(* $P < 0.05$), 胰岛素与 mFGF-21 协同注射组糖原含量(20.26 ± 0.37) mg/g 与对照组比较, 差异显著(* $P < 0.05$), 高剂量 mFGF-21 注射组糖原含量(22.88 ± 0.84) mg/g 与对照组比较, 差异极显著(** $P < 0.01$).

3 讨 论

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一种多功能活性物质^[6], FGF-21 是 Nishimura 等在 2000 年从小鼠胚胎中分离出来的 FGF 家族的一个新成员, 其主要在肝脏中表达。虽然 FGF-21 发现较早, 但直到 2005 年才有文献对其功能进行报道。FGF-21 是一种安全、可靠、不依赖于胰岛素的代谢调节因子, 参与糖脂代谢的调节过程, 已有大量实验证明它是除胰岛素外, 生物体内又一个能够独立调节糖代谢的因子^[7]。尽管人们对 FGF-21 的功能进行了大量的研究, 从细胞到动物, 涉及了代谢的众多层面, 但是对 FGF-21 在 1 型糖尿病动物模型上调节糖代谢的研究, 在国内外文献中均无报道。本研究通过改良传统 STZ 造模方法, 采用腹腔小剂量多次给药, 在严格控制小鼠体重和健康的情况下, 提高了造模的成功率, 大幅度降低 STZ 用量, 减少研究成本。更为重要的是利用小剂量多次注射 STZ, 能够诱导小鼠产生迟发性的糖耐量异常, 较准确地模拟糖尿病患者的真实空腹血糖, 反映糖尿病从发生、发展到临床症状期的特征。这也正是传统造模方法所无法比拟的优势所在。这种方法为糖尿病预防、治疗和发病机制的研究提供了更为适合、简便且经济的动物实验平台。本文利用 1 型糖尿病模型对 mFGF-21 的糖代谢效果及机制进行研究。通过监测模型鼠注射蛋白质后短期血糖变化, 发现 mFGF-21 能够调节此类模型的血糖水平, 并呈剂量依赖性。胰岛素单独注射虽能够使模型动物血糖有所下降, 但持续时间十分短暂。本实验室的大量研究表明, 鼠源 FGF-21 和人源 FGF-21 在促进脂肪细胞糖代谢过程中与胰岛素有协同作用^[8-9]。本文对迟发性的 1 型糖尿病动物模型上对 mFGF-21 与胰岛素的协同作用关系进行探讨, 证明 mFGF-21 能够在此类模型上增强胰岛素作用效果和持续时间。

模型动物长期治疗效果发现, 虽然低剂量 mFGF-21(0.125 mg/kg)注射在短期内对血糖的控制不是十分理想, 但在长期注射后仍然可以对血糖有所调控, 特别是糖基化血红蛋白水平的降低更是充

分证实了低剂量 mFGF-21 对模型动物的血糖也具有持续的调控作用。推测是由于注射剂量较低, 在短期内起效缓慢, 效果并不显著, 经过长期注射后低剂量 mFGF-21 在动物体内缓慢起效, 由于量的积累使降糖效果逐渐增强且显著。胰岛素单独注射后, 动物在 2 h 内血糖水平恢复至正常, 随后升至注射前水平。虽然经胰岛素长期注射, 但其降糖效果持续时间短, 在每天注射一次的前提下, 模型动物在胰岛素处理期间, 大部分时间里还是处于高血糖状态, 反映长期血糖水平的糖基化血红蛋白未降低, 但较生理盐水注射组仍可控制血糖和糖基化血红蛋白的继续上升。低剂量(0.125 mg/kg) mFGF-21 长期注射虽有效果但较高剂量注射组仍有一定差距, 胰岛素长期注射组对血糖长期调控效果并不明显。低剂量 mFGF-21(0.125 mg/kg)与胰岛素的混合组在短期血糖调控效果上体现了与高剂量 mFGF-21 等同甚至更优越的效果。长期注射后, 同样也在血糖调控上体现了超越其他各处理组的优势。mFGF-21 调控血糖短效实验结果表明, 胰岛素与低剂量 mFGF-21 配合使用的情况下, 延长了速效胰岛素原本只有 2 h 的调控血糖持续时间至 6 h, 低剂量的 mFGF-21 在胰岛素的配合下与高剂量 mFGF-21 降糖效果相比较, 加快了起效所需时间。mFGF-21 调控血糖长效实验结果表明, 低剂量 mFGF-21 混合胰岛素长期注射对血糖的调控效果较相同剂量的 mFGF-21 与胰岛素单独注射效果提高显著, 且在减少 mFGF-21 剂量的情况下与高剂量 mFGF-21 起到了同样的血糖调控效果。

肝脏是人体最重要的代谢器官之一, 具有非常复杂的生理、生化功能, 在维持血糖恒定的过程中发挥着不可取代的作用^[10]。葡萄糖在哺乳动物体内需要葡萄糖转运蛋白(GLUTs)的协助进入细胞内^[11]。GLUT1、4 是葡萄糖转运过程中最为重要的两个与代谢相关的膜蛋白^[12-14]。实时定量 PCR 结果表明, 与胰岛素调控 GLUT4 表达不同的是, 高剂量 mFGF-21 长期注射后, 通过促进 GLUT1 的表达来促进动物机体摄取葡萄糖。而且, 胰岛素与低剂量 mFGF-21 协同注射可同时上调 GLUT1 和 4 的表达量, 更大程度地提高机体对葡萄糖的摄取。同时, 糖原检测结果表明, 胰岛素与低剂量 mFGF-21 协同注射和高剂量 mFGF-21 长期注射模型动物均可促进动物肝脏组织糖原的合成, 且效果均优于胰岛素长期注射, 其中尤以高剂量 mFGF-21 促糖原合成能力最为显著。综合以上结果, 表明 mFGF-21

是通过增加 GLUT1 的表达, 增加机体对葡萄糖的摄取, 增加糖原的合成来调节体内糖代谢。本研究对 mFGF-21 调节模型动物的糖代谢效果及部分肝糖代谢机制进行了初步研究, 为利用 FGF-21 治疗 1 型糖尿病和传统胰岛素疗法提供了新的方案和思路, 为 FGF-21 研发成治疗糖尿病的新型药物提供了重要的动物实验依据。

参 考 文 献

- [1] Moller D E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 2001, **414**(6865): 821-827
- [2] Kharitonov A, Dunbar J D, Bina H A, *et al.* FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by beta Klotho. *Cell Physiol*, 2008, **215**(1): 1-7
- [3] Wente W, Efanov A M, Brenner M, *et al.* Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*, 2006, **55**(9): 2470-2478
- [4] 刘铭瑶, 王文飞, 于艺雪, 等. 成纤维细胞生长因子(FGF)-21 改善胰岛素抵抗肝细胞对葡萄糖的吸收和肝糖原的合成. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 1327-1333
- [5] Liu M Y, Wang W F, Yu Y X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1327-1333
- [5] 张均田, 包图娅, 曹恩华, 等. 现代药理实验方法(上、下). 北京: 北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1997: 984-985
- [6] Zhang J T, Bao T Y, Cao E H, *et al.* *Modern Experimental Methods In Pharmacology*(Volume 1, 2). Beijing: Peking University Medical Press, 1997: 984-985
- [6] 刘建雷, 李 伶, 杨刚毅. 成纤维细胞生长因子-21 的研究进展. *检验医学与临床*, 2007, **4**(7): 642-643
- [7] Liu J L, Li L, Yang G Y. *Lab Med Clin*, 2007, **4**(7): 642-643
- [7] 王文飞, 李校堃, 李德山. 糖尿病治疗的新视点 - 成纤维生长因子 21. *中国药理学通报*, 2009, **25**(4): 433-435
- [8] Wang W F, Li X K, Li D S. *Chin Pharm Bull*, 2009, **25**(4): 433-435
- [8] 姜媛媛, 刘铭瑶, 任桂萍, 等. 鼠源成纤维细胞生长因子-21 对脂肪细胞糖代谢的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 157-164
- [9] Jiang Y Y, Liu M Y, Ren G P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 157-164
- [9] 李晋南, 刘铭瑶, 侯玉婷, 等. 人源 FGF-21 在脂肪细胞糖代谢中的作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, **25**(6): 556-562
- [10] Li J N, Liu M Y, Hou Y T, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(6): 556-562
- [10] Postic C, Dentin R, Girard J, *et al.* Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab*, 2004, **30**(5): 398-408
- [11] Kayano T, Burant C F, Fukumoto H, *et al.* Human facilitative glucose transporters. *J Biol Chem*, 1990, **265**(22): 13276-13282
- [12] Takata K, Kasahara T, Kasahara M, *et al.* Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **173**(1): 67-73

- [13] Zhao F Q, Glimm D R, Kennelly J J, *et al.* Distribution of mammalian facultative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. *Int J Biochem*, 1993, **25**(12): 1897–1903
- [14] Hosake T, Brooks C C, Presman E, *et al.* p115 interacts with the

GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(6): 2882–2890

Fibroblast Growth Factor-21 Mediates Hepatic Glucose Metabolism of Type 1 Diabetes Model and Its Mechanism*

SUN Guo-Peng¹⁾, YE Xian-Long²⁾, REN Gui-Ping²⁾, LI Jin-Nan²⁾, LI De-Shan^{2)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Xin Xiang University, Xinxiang 453000, China;

²⁾ College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Fibroblast growth factor(FGF)-21 is a new member of the fibroblast growth family. Recent studies show that FGF-21 is a novel regulator for glycemic control in various type 2 DM models. However, its potential to treat type 1 diabetes mellitus has not been explored. An evaluation of the function and mechanism of FGF-21 was made in hepatic glucose metabolism of type 1 diabetes mouse model with slow-onset of the impaired glucose tolerance induced by STZ. The mice were administrated with FGF-21, the mRNA expression of GLUT1 and 4 in the liver were detected by the real-time PCR and glycogen synthesis was examined by the anthrone method. The results showed that FGF-21 could lower the blood glucose level of the type 1 diabetes model in a dose-dependent manner. The blood glucose level of the experimental animals maintained at normal level by injection of the FGF-21 once a day. For the first time, the synergistic effect of FGF-21 with insulin in the animal model was found. Unlike insulin that stimulated GLUT4 expression, FGF-21 could increase the mRNA expression of GLUT1, co-treatment (CT) with insulin and FGF-21 could increase the mRNA expression of both GLUT1 and 4. After long term treatment, the same as insulin, FGF-21 also stimulated glycogen synthesis of the model mice. The results suggested that FGF-21 can regulate glucose metabolism through GLUT1 expression, stimulate glycogen synthesis and improve glucose metabolism in type 1 diabetes model. Moreover, CT administration could increase both GLUT1 and 4 expressions. These data provide the first evidence for clinic application of FGF-21 for treatment of type 1 diabetes patients.

Key words fibroblast growth factor-21, slow-onset type 1 diabetes animal model, glucose metabolic, synergy effect with insulin, diabetes therapeutic agent

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00098

*This work was supported by grants from Science and Technology Planning Program of Heilongjiang Province (2006G0461-00), Harbin Municipal Science and Technology Innovation and Talent Development Program (2006RFXS002).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@126.com

Received: March 2, 2011 Accepted: May 4, 2011