文章编号:1000-5404(2013)10-0973-04

论著

NNC 55-0396对db/db小鼠的降糖作用及其机制

路玉洁,隆 敏,徐梓辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

[摘要] **目的** 探讨NNC 55-0396对db/db糖尿病小鼠的降糖作用及其机制。**方法** 取8周龄雄性野生型非糖尿病小鼠及db/db糖尿病鼠各12只,分别按随机数字表法为2组,共4组:野生安慰剂组、野生NNC干预组、db/db安慰剂组及db/db NNC干预组($n=6$)。NNC干预组均予30 mg/(kg·d)剂量NNC 55-0396腹腔注射,安慰剂组予等体积生理盐水腹腔注射,干预1周;比较实验动物药物干预前后血糖、体质量、胰岛素及总胆固醇的变化水平,并用免疫组织化学法及Western blot检测T型钙通道特异性亚基Cav3.1及Cav3.2表达水平。**结果** ①与db/db安慰剂组比较,db/db NNC干预组空腹血糖水平显著下降($P<0.01$),而野生安慰剂组和野生NNC干预组之间差异无统计学意义($P>0.05$);②与db/db安慰剂组比较,db/db NNC干预组体质量、胰岛素及胆固醇水平均明显降低($P<0.05$);③NNC 55-0396显著下调db/db糖尿病鼠Cav3.1及Cav3.2在肝脏及脑组织中的蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** NNC 55-0396通过调节小鼠体内钙离子水平产生降血糖作用。

[关键词] 糖尿病;NNC 55-0396;db/db小鼠;血糖
[中图法分类号] R587.1;R965;R977.15 [文献标志码] A

Hypoglycemic effect and mechanism of NNC 55-0396 in db/db mice

Lu Yujie, Long Min, Xu Zihui (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To explore the hypoglycemic effect and mechanism of NNC 55-0396 on db/db mice. Methods Twelve wild-type non-diabetic mice and 12 db/db mice were respectively separated into 4 groups by the stochastic indicator method including a wild-type control therapy group, a wild-type NNC group, a db/db control group and a db/db NNC group (6 mice per group). The mice of both NNC groups were given intraperitoneal injection of NNC 55-0396 at a dose of 30 mg/(kg·d) for 7 d, while those of both control groups were given intraperitoneal injection of saline in an identical manner. Changes of plasma glucose, body weight, basal insulin and total cholesterol were compared after drug administration. Protein expression levels of T-type calcium channel subunits Cav3.1 and Cav3.2 were also examined by immunohistochemistry and Western blotting. Results (1) Compared with the db/db control mice, the level of fasting blood glucose of diabetic db/db mice was significantly lowered ($P<0.01$) after NNC 55-0396 treatment. No statistical difference was observed between the two wild type groups. (2) Compared with the db/db control mice, body weight and the levels of insulin and cholesterol of diabetic db/db mice were significantly lowered ($P<0.05$) after NNC 55-0396 treatment. (3) NNC 55-0396 significantly decreased the protein expression of Cav3.1 and Cav3.2 in the liver and brain of db/db mice. Conclusion NNC 55-0396 lowers blood glucose by adjusting the level of Ca^{2+} *in vivo*, providing a new mechanism for the treatment of diabetes.

[**Key words**] diabetes mellitus; NNC 55-0396; db/db mice; blood glucose

Corresponding author: Xu Zihui, E-mail: zihuixu@yahoo.com.cn

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一组因长期慢性高血糖而致机体外周组织胰岛素敏感性降低,伴或不伴胰岛β细胞合成胰岛素能力缺陷的内分泌性疾病[1]。早有研究证实糖尿病患者存在细胞内钙离子调节紊乱,新近研究[2]表明,胰岛β细胞属电兴奋性细胞,β细胞膜ATP依赖的钙通道及钾通道是影响胰岛素分泌的重要离子通道,在人类和啮齿类动物中T型钙离子通道影响葡萄糖诱导胰岛素分泌水平。钙离

[通信作者] 徐梓辉,E-mail:zihuixu@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130308.1536.010.html(2013-03-08)

子通道阻滞剂是一种通过阻断细胞膜钙离子通道,抑制胞外钙离子内流,使胞内钙离子水平降低,继而调节靶器官功能的药物。NNC 55-0396是一种新合成的高选择性T型钙离子阻滞剂[3],本研究拟利用NNC 55-0396干预db/db小鼠,观察其降糖疗效及T型钙离子通道特异性亚基Cav3.1及Cav3.2的表达[4],并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验分组及药物剂量 8周龄雄性野生型非糖尿病小鼠,体质量(22.8±1.2)g,同龄同窝db/db小鼠,体质量(42.6±2.3)g,各12只,按照随机数字表法各种属分2组,共4组:野生安慰剂组、野生NNC干预组、db/db安慰剂组及db/db NNC干预组($n=6$)。实验动物均由美国Jacksons实验室购得(符合国家级动物标准),按照SPF级饲养标准适应性喂养1周后进行药物干预。采用腹腔注射方式给药,NNC 55-0396 1次剂量为15 mg/(kg·d),安慰剂为等体积生理盐水,2次/d,干预1周。实验期间所有动物均予普通饲料喂养,自由饮水。

1.1.2 药品及试剂 NNC 55-0396(美国Sigma公司,批号:059K4615V),强生稳豪倍优型血糖仪、强生稳豪型血糖试纸(美国强生公司),DMSO(美国Sigma公司),胰岛素Elisa Kit(瑞士Mercodia公司),总胆固醇Elisa Kit(美国R&D公司),哺乳动物组织裂解液(美国Thermo公司),BCA试剂盒(上海碧云天公司),兔抗β-tubulin多克隆抗体、山羊抗Cav3.2多克隆抗体(美国Santa Cruz公司),兔抗Cav3.1多克隆抗体(美国Sigma公司),脱脂蛋白封闭干粉(武汉博士德公司),HPR标记山羊抗兔IgG二抗、HPR标记驴抗山羊IgG二抗(北京中杉金桥公司),显影液(美国Thermo公司)。

1.1.3 主要仪器 石蜡切片机、激光共聚焦荧光显微镜(德国Leica公司),光学显微镜(日本Nikon公司),电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪、iMark酶标仪(美国Bio-Rad公司),脱色摇床(美国Thermo公司)。

1.1.4 取材 药物干预结束后,予1%戊巴比妥溶液腹腔注射,麻醉后心脏取血,约0.8 mL。血样置4 ℃冰箱3~4 h,待血液凝结后,将血样置于离心机中,以12 000×g离心10 min,分装后置-20 ℃储存,以备酶联免疫吸附法检测之用;取血结束后,取肝脏及脑组织,PBS涮洗数次后分装,部分用4%多聚甲醛4 ℃浸泡14 h,常规石蜡切片,部分予液氮速冻用以Western blot,为防止蛋白降解,取材过程于冰上进行。

1.2 方法

1.2.1 基础指标及生化指标检测 小鼠禁食8 h后称量体质量并采尾血测定空腹血糖。处死后的离心血浆应用酶联免疫吸附法测定胰岛素及胆固醇变化水平。

1.2.2 免疫组织化学与免疫荧光

1.2.2.1 免疫组化 石蜡切片置于65 ℃烘箱中烘片2 h,二甲苯脱蜡至水,柠檬酸修复液微波抗原修复8 min,PBS漂洗切片3次,每次5 min,甩干后5% BSA封闭20 min,去除BSA液后每张切片兔抗Cav3.1或山羊抗Cav3.2(工作浓度为1∶100)覆盖组织,4 ℃过夜,阴性对照组滴加PBS代替一抗。PBS漂洗3次,每次5 min,滴加相应种属的二抗,室温下孵育1 h,PBS漂洗,DAB显色。最后脱水、透明、封片后显微镜下拍照。

1.2.2.2 免疫荧光 石蜡切片滴加二抗前所有步骤同免疫组化步骤,加入荧光二抗后避光孵育1 h,并每张切片加50~100 μL DAPI避光染核5 min,用抗荧光淬灭封片剂封片,4 ℃避光保存拍照。

1.2.3 Western blot检测 取材同1.1.4,按照哺乳动物组织裂解液说明书步骤进行冰上蛋白提取,采用BCA法测定蛋白浓度。每孔上样100 μg作SDS-PAGE电泳,用湿转法将蛋白转印纸PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭,室温至脱色摇床上孵育1~2 h,孵育兔抗Cav3.1或山羊抗Cav3.2(工作浓度为1∶200),4 ℃过夜,1×TBST工作液洗膜后,室温孵育对应辣根标记物二抗1.5 h,再次1×TBST工作液洗膜后,显影液显色后置凝胶成像仪拍照保存。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计处理,数据以$\bar{x}\pm s$表示。计量资料行t检验。Western blot图片用Quantity One行相对光密度值量化分析。

2 结果

2.1 NNC 55-0396对体质量、血糖、胰岛素及胆固醇水平的影响

NNC 55-0396干预1周后,db/db NNC干预组体质量较db/db安慰剂组明显减轻($P<0.05$),野生NNC干预组较野生安慰剂组无明显差异($P>0.05$)。较db/db安慰剂组比,db/db NNC干预组血糖水平显著下降($P<0.01$),野生NNC干预组较野生安慰剂组均无明显差异($P>0.05$)。同时,db/db NNC干预组血浆胰岛素及胆固醇水平较db/db安慰剂组明显下降($P<0.05$),野生NNC干预组较野生安慰剂组无明显差异($P>0.05$)。见表1。

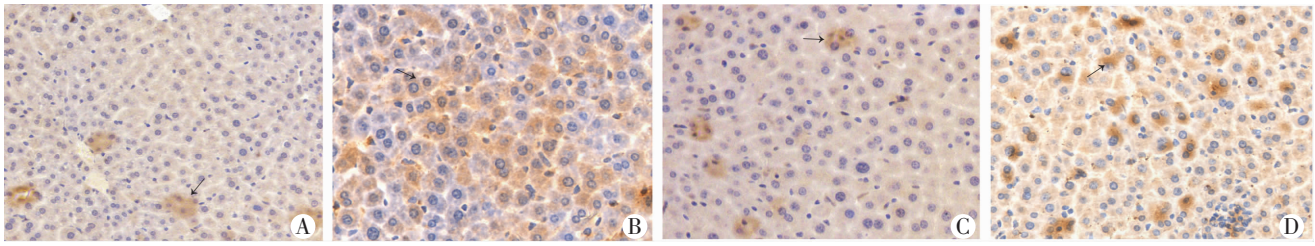
表1 NNC 55-0396对4组小鼠体质量、血糖、胰岛素及胆固醇的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	血糖(mg/dL)	胰岛素(μg/L)	胆固醇(mmol/L)
野生安慰剂组	24.69±0.37	140.42±5.83	1.18±0.06	1.41±0.18
野生NNC干预组	22.96±0.31	112.91±1.85	1.15±0.15	1.28±0.07
db/db安慰剂组	45.11±0.47	523.32±11.89	3.31±0.12	2.61±0.16
db/db NNC干预组	34.96±0.24[a]	244.41±19.17[b]	2.79±0.14[a]	1.71±0.14[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与db/db安慰剂组比较

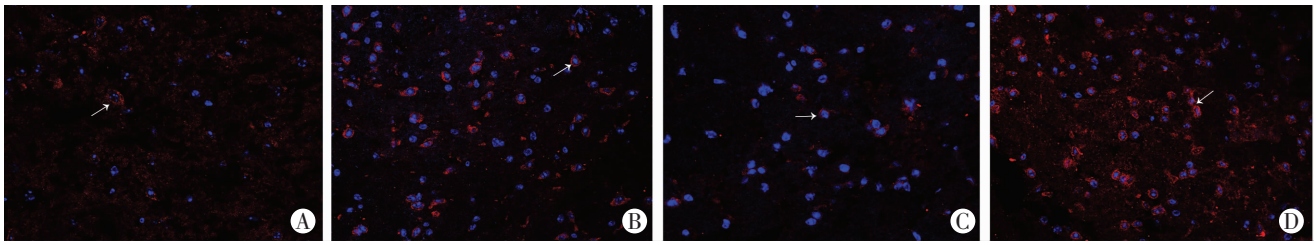
2.2 Cav3.1、Cav3.2在野生安慰剂组及db/db安慰剂组不同组织中的表达

免疫组织化学与免疫荧光检测发现野生安慰剂组及db/db安慰剂组肝脏和脑组织中存在Cav3.1及Cav3.2表达。Cav3.1及Cav3.2在db/db安慰剂组肝脏及脑组织中均呈强阳性表达,但在野生安慰剂组仅有少量表达,其差异具统计学意义($P<0.05$),见图1、2,表2。



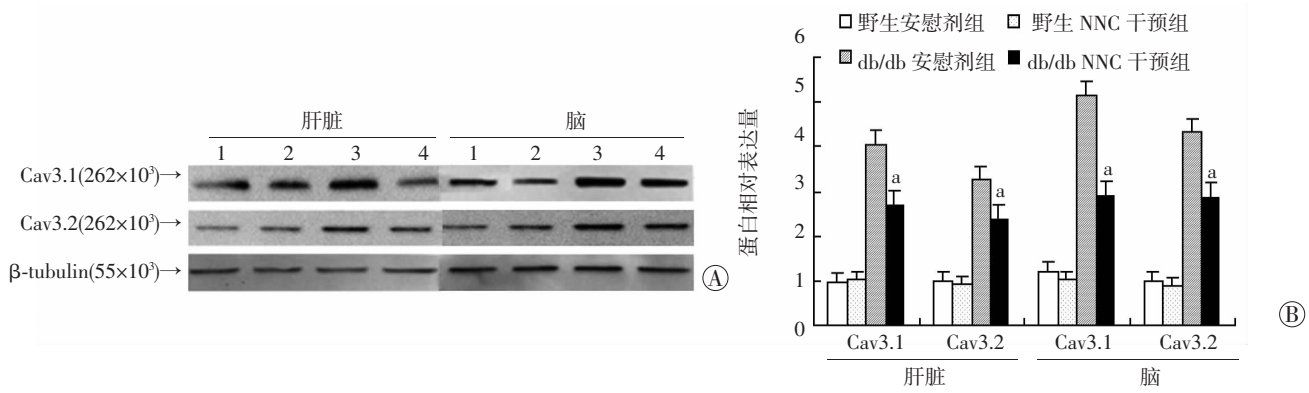
A:野生安慰剂组 Cav3.1 表达;B:db/db 安慰剂组 Cav3.1 表达;C:野生安慰剂组 Cav3.2 表达;D:db/db 安慰剂组 Cav3.2 表达 ↑:阳性表达

图 1 免疫组化观察野生安慰剂组及 db/db 安慰剂组小鼠肝脏组织中 Cav3.1、Cav3.2 表达 (S-P ×400)



A:野生安慰剂组 Cav3.1 表达;B:db/db 安慰剂组 Cav3.1 表达;C:野生安慰剂组 Cav3.2 表达;D:db/db 安慰剂组 Cav3.2 表达 ↑:阳性表达

图 2 免疫荧光观察野生安慰剂组及 db/db 安慰剂组小鼠脑组织中 Cav3.1、Cav3.2 表达 (S-P ×400)



A:Western blot 1:野生安慰剂组;2:野生 NNC 干预组;3:db/db 安慰剂组;4:db/db NNC 干预组; B:半定量分析 a:$P<0.05$,与同期 db/db 安慰剂组比较

图 3 Western blot 检测各组小鼠肝脏及脑组织中 Cav3.1、Cav3.2 的表达

表 2 野生安慰剂组及 db/db 安慰剂组小鼠肝脏及脑组织 Cav3.1、Cav3.2 的相对表达量 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Cav3.1 肝脏	Cav3.1 脑	Cav3.2 肝脏	Cav3.2 脑
野生安慰剂组	2.79±0.28	2.89±0.37	1.69±0.32	2.35±0.17
db/db 安慰剂组	7.69±0.31[a]	9.21±0.51[b]	5.78±0.41[a]	8.78±0.58[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与野生安慰剂组比较

2.3 NNC 55-0396 对肝脏、脑组织中 Cav3.1 及 Cav3.2 表达的影响

Western blot 检测发现,与 db/db 安慰剂组比较, db/db NNC 干预组肝脏及脑组织中 Cav3.1 及 Cav3.2 表达水平显著下降($P<0.05$),但野生安慰剂组与野生 NNC 干预组差异无显著性($P>0.05$),见图 3。

3 讨论

大量研究[5-6]结果表明,1 型和 2 型糖尿病均伴有不同程度的钙离子水平异常。钙离子信号通路对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞具有重要的调节作用[7]。在 2 型糖尿病发病过程中因 β 细胞内胰岛素长期过表达,导致胞内 ATP 水平升高,诱导 K-ATP 通道关闭,触发膜去极化,进而钙离子通道开放,胞内钙离子水平升高,最终导致胰岛素胞外分泌减少[8]。研究[9]发现,T 型钙离子通道由于其独特的低电压激活的电压门控性,在调节基础钙离子水平中发挥重要作用。Mibefradil 是一种选择性 T 型钙离子通道阻滞剂, NNC 55-0396 作为其新近合成的衍生物,高选择性作用 T 型钙

离子通道[3]。近年来NNC 55-0396被广泛用于肿瘤研究[10-11],也有研究[12]发现其与胚胎神经发育相关,说明其具广泛的生物学活性。然而,目前有关T型钙离子通道阻滞剂对糖尿病治疗作用的研究报道甚少。

本研究发现T型钙离子通道特异性阻滞剂NNC 55-0396显著降低db/db小鼠空腹血糖水平,亦有减少体质量、血浆胰岛素及胆固醇作用,但其对野生型小鼠空腹血糖、体质量、胰岛素及胆固醇水平均无明显影响。有研究[13]报道,Mibefradil作用INS-1及INS-1E细胞株可产生抑制葡萄糖诱导胰岛素生成作用,同时,T型钙通道阻滞剂作用KO小鼠产生明显控制体质量作用[14],本研究结果与其相似,但至今并未见相关研究对其调节血糖作用进行报道。

进一步研究发现,野生型及db/db鼠肝脏及脑组织中均存在T型钙离子特异性亚基Cav3.1与Cav3.2的表达,且db/db鼠呈强阳性,而野生型鼠仅少量表达。推测NNC 55-0396通过选择性地下调db/db糖尿病鼠Cav3.1和Cav3.2水平,进而调节T型钙离子通道活性,影响胞内钙离子水平,最终降低血糖。Cav3.1与Cav3.2被发现存在于胚胎期的心脏组织[15]、胰岛β细胞[16]及肌肉组织中[17],然而,令人疑惑的是本研究并未发现脂肪、骨骼肌及心脏等存在Cav3.1与Cav3.2表达,这是否与不同组织主要糖代谢途径不完全一致有关函待进一步研究证实。

综上,本研究结果揭示NNC 55-0396通过选择性地下调T型钙离子通道特异性亚基Cav3.1和Cav3.2水平,继而降低空腹血糖。这可能为2型糖尿病药物研发提供新的靶点。

参考文献:

[1] Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.

[2] Walz H A, Wierup N, Vikman J, *et al*. Beta-cell PDE3B regulates Ca^{2+}-stimulated exocytosis of insulin[J]. Cell Signal, 2007, 19(7): 1505-1513.

[3] Alvina K, Ellis-Davies G, Khodakhah K. T-type calcium channels mediate rebound firing in intact deep cerebellar neurons [J]. Neuroscience, 2009, 158(2): 635-641.

[4] Cain S M, Snutch T P. Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing[J]. Channels (Austin), 2010, 4(6): 475-482.

[5] Le-Douairon-Lahaye S, Gratas-Delamarche A, Malarde L, *et al*. Combined insulin treatment and intense exercise training improved basal cardiac function and Ca(2+)-cycling proteins expression in type 1 diabetic rats[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2012, 37(1): 53-62.

[6] de-Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, *et al*. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial [J]. Lancet, 2010, 376(9752): 1543-1551.

[7] Roseman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic α- and b-cells in health and disease[J]. Cell Calcium, 2012, 51(3/4): 300-308.

[8] Fukao K, Shimada K, Hiki M, *et al*. Effects of calcium channel blockers on glucose tolerance, inflammatory state, and circulating progenitor cells in non-diabetic patients with essential hypertension: a comparative study between azelnidipine and amlodipine on glucose tolerance and endothelial function--a crossover trial (AGENT) [J]. Cardiovasc Diabetol, 2011, 10: 79.

[9] Li M, Hansen J B, Huang L, *et al*. Towards selective antagonists of T-type calcium channels: design, characterization and potential applications of NNC 55-0396[J]. Cardiovasc Drug Rev, 2005, 23(2): 173-196.

[10] Lu F, Chen H, Zhou C, *et al*. T-type Ca^{2+} channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation[J]. Cell Calcium, 2008, 43(1): 49-58.

[11] Taylor J T, Huang L, Pottle J E, *et al*. Selective blockade of T-type Ca2+ channels suppresses human breast cancer cell proliferation[J]. Cancer Lett, 2008, 267(1): 116-124.

[12] Louhivuori LM, Louhivuori V, Wigren H K, *et al*. Role of low voltage activated calcium channels in neuritogenesis and active migration of embryonic neural progenitor cells[J]. Stem Cells Dev, 2013, [Epub ahead of print].

[13] Orecna M, Hafko R, Toporcerova V, *et al*. Cell swelling-induced insulin secretion from INS-1E cells is inhibited by extracellular Ca^{2+} and is tetanus toxin resistant[J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26(2): 197-208.

[14] Uebele V N, Gotter A L, Nuss C E, *et al*. Antagonism of T-type calcium channels inhibits high-fat diet-induced weight gain in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1659-1667.

[15] Mizuta E, Shirai M, Arakawa K, *et al*. Different distribution of Cav3.2 and Cav3.1 transcripts encoding T-type Ca(2+) channels in the embryonic heart of mice[J]. Biomed Res, 2010, 31(5): 301-305.

[16] Yang S N, Berggren P O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology[J]. Endocr Rev, 2006, 27(6): 621-676.

[17] Pluteanu F, Cribbs L L. Regulation and function of Cav3.1 T-type calcium channels in IGF-I-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(3): C517-C525.

(**收稿**:2013-01-05;**修回**:2013-02-28)

(编辑 栾 嘉)