

# 胃饥饿素在妊娠糖尿病患者外周血与脐带血中的表达及其对高糖所致胰岛 B 细胞凋亡及功能损伤的影响<sup>▲</sup>

曾燕<sup>1</sup> 勾宪飞<sup>2</sup> 陈晓燕<sup>3</sup> 许志新<sup>4</sup>

(1 重庆市第七人民医院妇产科,重庆市 400069,电子邮箱:demeterpow@163.com;

2 重庆市涪陵区妇幼保健院产科,重庆市 408000;3 重庆市中医院妇科,

重庆市 400000;4 重庆医科大学基础医学院,重庆市 400016)

**【摘要】** **目的** 分析妊娠糖尿病(GDM)患者外周血及脐带血中的胃饥饿素水平,并初步探讨胃饥饿素对高糖所致胰岛 B 细胞凋亡及功能损伤的影响及其作用机制。**方法** (1)选取 50 例 GDM 患者(GDM 组)与 50 例正常孕产妇(对照组),检测其外周血及脐带血胃饥饿素水平。分析两组外周血与脐带血胃饥饿素水平的相关性,以及 GDM 组外周血和脐带血胃饥饿素水平与血糖、胰岛素代谢指标的相关性。(2)将体外培养的胰岛 B 细胞 MIN6 分为对照组(无干预)、阴性对照慢病毒载体(LV-NC)组、胃饥饿素过表达慢病毒载体(LV-胃饥饿素)组、高糖组、高糖+LV-NC 组、高糖+LV-胃饥饿素组、高糖+磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抑制剂(LY294002)组进行实验。给予慢病毒载体转染或药物干预后,各高糖干预组细胞采用含 20.0 mmol/L 葡萄糖的培养基进行培养,其余组采用含 5.0 mmol/L 葡萄糖的培养基进行正常培养。检测对照组、LV-NC 组、LV-胃饥饿素组细胞的胃饥饿素表达水平以了解转染情况。检测对照组、各高糖干预组细胞增殖和细胞凋亡情况(除高糖+LY294002 组外)、PI3K/蛋白激酶 B(Akt)通路相关蛋白表达水平;除高糖+LY294002 组外,检测各组细胞的胰岛素含量。**结果** (1)GDM 组外周血及脐带血中胃饥饿素水平均低于对照组,且两组外周血胃饥饿素水平与脐带血胃饥饿素水平均呈正相关(均  $P < 0.05$ )。GDM 患者外周血及脐带血中的胃饥饿素水平均与其空腹血糖、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数呈负相关(均  $P < 0.05$ )。(2)LV-胃饥饿素组胃饥饿素 mRNA 及蛋白的表达水平高于其他两组(均  $P < 0.05$ )。与对照组比较,高糖组培养 48 h 时的细胞增殖能力、磷酸化 Akt/Akt 蛋白比值降低,而细胞凋亡率、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)和活化型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved-Caspase-3)蛋白表达水平均升高(均  $P < 0.05$ );与高糖组、高糖+LV-NC 组比较,高糖+LV-胃饥饿素组的细胞增殖能力增高而细胞凋亡率降低;与高糖组、高糖+LV-NC 组、高糖+LY294002 组相比,高糖+LV-胃饥饿素组的磷酸化 Akt/Akt 蛋白比值升高,而 Bax 及 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均降低(均  $P < 0.05$ )。在低糖或高糖条件下,LV-胃饥饿素组的胰岛素释放能力均较低糖组或高糖组明显增加( $P < 0.05$ )。**结论** GDM 患者外周血及脐带血中胃饥饿素水平均降低,且其与血糖、胰岛素代谢密切相关。过表达胃饥饿素能够通过促进 PI3K/Akt 信号通路的活性来改善高糖所致的胰岛 B 细胞损伤及功能障碍。

**【关键词】** 妊娠糖尿病;胃饥饿素;外周血;脐带血;胰岛 B 细胞;细胞凋亡;细胞功能障碍;磷脂酰肌醇 3-激酶;蛋白激酶 B

**【中图分类号】** R 714.256 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2021)13-1590-08

**DOI:**10.11675/j.issn.0253-4304.2021.13.15

## Expression of ghrelin in peripheral blood and umbilical cord blood of patients with gestational diabetes mellitus and its effect on apoptosis and function damage of islet $\beta$ cells induced by high glucose

ZENG Yan<sup>1</sup>, GOU Xian-fei<sup>2</sup>, CHEN Xiao-yan<sup>3</sup>, XU Zhi-xin<sup>4</sup>

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Chongqing Seventh People's Hospital, Chongqing 400069, China;

2 Department of Obstetrics, Chongqing Fuling District Maternal and Child Health Care Hospital, Chongqing 408000, China;

3 Department of Gynecology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400000, China;

4 School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**▲基金项目:**重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0749)

**作者简介:**曾燕(1973~),女,本科,副主任医师,研究方向:产科疾病的临床治疗。

**通信作者:**勾宪飞(1982~),男,本科,主治医师,研究方向:产科疾病的临床治疗,电子邮箱:820368164@qq.com。

**【Abstract】 Objective** To analyze the levels of ghrelin in peripheral blood and umbilical cord blood of patients with gestational diabetes mellitus (GDM), and to preliminarily explore the effect of ghrelin on islet  $\beta$  cell apoptosis and function damage induced by high glucose as well as its action mechanism. **Methods** (1) Fifty GDM patients (GDM group) and 50 normal pregnant women (control group) were selected to detect the levels of ghrelin in their peripheral blood and umbilical cord blood. An analysis was performed on the correlation between peripheral blood and umbilical cord blood ghrelin levels in both groups, as well as the correlation of peripheral blood and umbilical cord blood ghrelin levels with the indices of blood glucose and insulin metabolism in the GDM group. (2) Islet  $\beta$  cells MIN6 cultured *in vitro* were divided into control group (without intervention), negative control lentivirus vector (LV-NC) group, ghrelin and overexpressed lentivirus vector (LV-ghrelin) group, high glucose group, high glucose and LV-NC group, high glucose and LV-ghrelin group, and high glucose and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor (LY294002) group for the experiment. After lentivirus vector transfection or medicine intervention, cells in the high glucose intervention groups were cultured by using the culture medium containing 20.0 mmol/L glucose, the remaining groups received normal culture using the culture medium containing 5.0 mmol/L glucose. The expression level of ghrelin was detected in the control, LV-NC and LV-ghrelin groups to investigate the condition of transfection. Cell proliferation and cell apoptosis (except the high glucose and LY294002 group), and expression levels of PI3K/protein kinase B (Akt) pathway-related proteins were detected in the control group and all high glucose intervention groups; except the high glucose and LY294002 group, the content of insulin of the cells was detected in all groups. **Results** (1) The levels of ghrelin in peripheral blood and umbilical cord blood in the GDM group were lower than those in the control group, and there was a positive correlation between peripheral blood and umbilical cord blood ghrelin levels (all  $P < 0.05$ ). In GDM patients peripheral blood and umbilical cord blood ghrelin levels negatively correlated with FBG level, fasting insulin level, and insulin resistance index (all  $P < 0.05$ ). (2) The LV-ghrelin group reported higher expression levels of ghrelin mRNA and protein than the other two groups (all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the high glucose group exhibited decreased cell proliferation capacity and lower ratio of phosphorylated Akt to Akt protein at 48 hours of culture, and yielded increased cell apoptosis rate, higher expression levels of B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Cleaved-Caspase-3) proteins (all  $P < 0.05$ ); the high glucose and LV-ghrelin group exhibited increased cell proliferation capacity and decreased cell apoptosis rate in contrast with the high glucose group or the high glucose and LV-NC group; and the high glucose and LV-ghrelin group yielded elevated ratio of phosphorylated Akt to Akt protein and lower expression levels of Bax and Cleaved-Caspase-3 proteins in contrast with the high glucose group, the high glucose and LV-NC group, or the high glucose and LY294002 group (all  $P < 0.05$ ). Under the condition of low or high glucose, the LV-ghrelin group yielded a significantly higher insulin release capacity than the low and high glucose groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The levels of ghrelin in peripheral blood and umbilical cord blood are decreased in patients with GDM, and closely correlate with blood glucose and insulin metabolism. Overexpression of ghrelin can ameliorate high glucose-induced damage and dysfunction of islet  $\beta$  cells by promoting the activity of PI3K/Akt signaling pathway.

**【Key words】** Gestational diabetes mellitus, Ghrelin, Peripheral blood, Umbilical cord blood, Islet  $\beta$  cell, Cell apoptosis, Cell dysfunction, Phosphoinositide 3-kinase, Protein kinase B

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是一种常见的妊娠期并发症,影响全球约 25% 的孕妇<sup>[1-2]</sup>。GDM 严重影响母婴健康,其不仅是胎儿致死率、致残率增高的重要原因,还增加孕妇发生子痫、产后大出血及难产等并发症或不良预后的风险<sup>[3]</sup>。此外,GDM 患者及其子代远期更易发生 2 型糖尿病或肥胖等代谢紊乱疾病<sup>[4]</sup>。而在妊娠期间母体对胰岛素的敏感性会随着妊娠进展而逐渐降低,为维持正常的血糖水平,机体对胰岛素的需求量将显著增加<sup>[5]</sup>,故母体的胰岛 B 细胞数量增多及功能增强,以分泌更多的胰岛素应对母体升高的血糖浓度<sup>[6-7]</sup>。

因此,大量学者认为胰岛 B 细胞的数量减少及功能障碍与 GDM 的发生和发展密切相关<sup>[3,6-7]</sup>。

胃饥饿素是胃黏膜层  $\alpha$  细胞分泌的一种内源性活性肽,由 28 个氨基酸组成,相对分子量为 33 000,其作为生长激素促分泌素的内源性配体,能够显著刺激生长激素促分泌素的释放<sup>[8]</sup>。既往大量研究证实,GDM 患者体内的胃饥饿素表达显著降低,其可能与母体胰岛素抵抗的发生具有相关性<sup>[9-11]</sup>,但胃饥饿素在 GDM 患者胎儿体内的表达情况及其对胰岛 B 细胞功能的影响却尚未明确。因此本研究通过观察胃饥饿素在 GDM 患者与正常妊娠孕产妇血清及其脐

带血中的表达差异,分析胃饥饿素水平与 GDM 患者血糖、胰岛素代谢指标的相关性,并进一步探讨胃饥饿素对胰岛 B 细胞功能的影响,为阐明 GDM 及相关代谢疾病的发生和发展提供新的理论基础及实验室依据。

## 1 资料与方法

**1.1 临床标本来源** 选取 2018 年 4 月至 2019 年 4 月于重庆市第七人民医院妇产科住院分娩的 50 例 GDM 孕产妇(GDM 组),并选取同时期正常妊娠的 50 例孕产妇作为对照组。GDM 的诊断符合第 9 版《妇产科学》<sup>[12]</sup>中的相关标准,即在妊娠第 24~28 周空腹口服 75 g 葡萄糖进行 OGTT,达到空腹血糖 $\geq 5.1$  mmol/L、服糖后 2 h 血糖 $\geq 10.0$  mmol/L、服糖后 3 h 血糖 $\geq 8.5$  mmol/L 中任意一项即可诊断为 GDM。所有孕产妇均为单胎妊娠且经阴道分娩。排除合并心脑血管、肺、肝、肾等疾病者,合并甲状腺等内分泌疾病者及妊娠前确诊为糖尿病者。所有研究对象均签署知情同意书,本研究已通过我院医学伦理委员会审批。

**1.2 细胞系及主要试剂** 胰岛 B 细胞 MIN6 购自中国科学院上海细胞库。RPMI-1640、胎牛血清购自美国 HyClone 公司(批号:AD15505803、AD14201137); $\beta$ -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、青链霉素混合液均为 100 U/mL 购自美国 Sigma 公司(批号:EZ1300F509、EZ0415D216、EZ419F107);细胞计数检测(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天(批号:D77041、D253071);大鼠抗小鼠胃饥饿素单克隆抗体、大鼠抗小鼠 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)单克隆抗体、人胃饥饿素酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 Abcam 公司(批号:ab10953、ab07409、ab50121);兔抗小鼠活化型合半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase, Cleaved-Caspase-3)单克隆抗体、大鼠抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购自美国 CST 公司(批号:40718T、20933T);兔抗小鼠蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)多克隆抗体,兔抗小鼠磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)多克隆抗体购自美国 Selleckchem 公司(批号:S1104、S1219);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山

羊抗兔或抗大鼠 IgG 二抗购自武汉博士德(批号:AR1075);SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司(批号:RR309AB);Opti-MEM 购自美国 Gibco 公司(批号:30152-D417);TRIzol、二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒购自美国 Invitrogen 公司(批号:129340、746286);小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(美国 Andygene 公司,批号:043-S5261B);其他试剂均为国产分析纯;胃饥饿素过表达慢病毒载体(LV-胃饥饿素)和阴性对照慢病毒载体(LV-NC)由上海凯基生物科技有限公司构建;PCR 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 样本采集及血糖检测:**所有研究对象均禁食 8~10 h,于次日采集其肘静脉血 5 mL,并于胎儿娩出且断脐后采集脐带血 3 mL。将收集到的外周静脉血与脐带血于室温下 2 200 r/min 离心 5 min,取上层血清,采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖及脐带血葡萄糖水平,应用放射免疫法测定空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)及脐带血胰岛素水平。计算稳态模型胰岛素抵抗(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)指数, HOMA-IR 指数=(空腹血糖 $\times$ FINS)/22.5。常规测量两组研究对象产前身高及体重,并计算其体质指数,体质指数=体重(kg)/身高<sup>2</sup>(m<sup>2</sup>)。

**1.3.2 外周血及脐带血胃饥饿素水平检测:**按照 ELISA 试剂盒使用说明方法检测两组孕产妇外周血及脐带血血清中胃饥饿素表达水平。实验单独重复 3 次。

**1.3.3 细胞培养、分组及慢病毒转染:**(1)细胞培养。常规复苏胰岛 B 细胞 MIN6 后,使用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、100  $\mu$ g/mL L-谷氨酰胺及 5  $\mu$ L/mL  $\beta$ -巯基乙醇的 RPMI-1640 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱进行培养。待 MIN6 细胞贴壁生长融合至 80% 时,使用 0.25% 的胰酶进行消化传代。(2)分组方法。将细胞分为 7 组进行实验。对照组,即正常培养且无任何特殊处理的 MIN6 细胞;LV-NC 组,即正常培养的转染 LV-NC 的 MIN6 细胞(RPMI-1640 葡萄糖浓度为 5.0 mmol/L);LV-胃饥饿素组,即正常培养的转染 LV-胃饥饿素的 MIN6 细胞(RPMI-1640 葡萄糖浓度为 5.0 mmol/L);高糖组,即采用葡萄糖浓度为 20.0 mmol/L 的培养液进行培养的 MIN6 细胞;高糖+LV-NC 组,即采用高糖(葡萄糖浓度为 20.0 mmol/L)培养液进行培养的转染 LV-NC 24 h 后

的 MIN6 细胞;高糖 + LV-胃饥饿素组,即采用高糖(葡萄糖浓度为 20.0 mmol/L)培养液进行培养的感染 LV-胃饥饿素慢病毒 24 h 后的 MIN6 细胞;高糖 + LY294002 组,即应用终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  的磷脂酰基醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)抑制剂 LY294002(美国 Sigma 公司,批号:EZ1018D031) 10  $\mu\text{M}$  进行预处理 30 min 后再经高糖(葡萄糖浓度为 20.0 mmol/L)培养液培养的 MIN6 细胞。上述各组细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养 24 h 后用于后续实验。(3)转染方法。转染前 24 h,取处于对数生长期的 MIN6 细胞进行常规消化后计数,按  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度接种至 6 孔板中,并加入 200  $\mu\text{L}$  预先使用 Opti-MEM 稀释的慢病毒液(感染复数 = 30),同时加入 12.5  $\mu\text{g}$  终质量浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的 Polybrene(美国 Sigma 公司,批号:EZ7409A231),充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养 24 h,弃除原培养液,更换为上述新鲜培养液,继续原条件培养 72 h 后,用 4  $\mu\text{g/mL}$  的嘌呤霉素进行筛选 10 d,取稳定感染后的细胞采用实时荧光 PCR 及蛋白质印迹法分别检测胃饥饿素 mRNA 及蛋白的表达。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力:收集生长状态良好的待测 MIN6 细胞,常规消化细胞后接种至 96 孔板中,调整细胞密度至  $2 \times 10^4$  个/孔,并向每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱培养,分别于 12 h、24 h、36 h、48 h 时向每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂后继续原条件培养 2 h,用酶标仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:HBS-1101)检测每孔于 490 nm 处的吸光度值,每个时间点每组设置 5 个复孔,绘制细胞的生长曲线。

1.3.5 Annexin V-FITC 法检测细胞凋亡情况:收集生长状态良好的待测 MIN6 细胞,2 200 r/min 离心 5 min,弃上清,使用 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞 2 次,2 min/次,按上述方法离心后收集细胞沉淀,用 195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,并调整细胞密度至  $7 \times 10^5$  个/mL。依次加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 及 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶染色液,轻轻摇晃离心管以充分混匀后,室温下避光孵育 30 min。300 目滤膜过滤细胞团块后,进行流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司,型号:FACSCalibur)检测细胞凋亡情况。实验单独重复 3 次。

1.3.6 胰岛素释放试验:取生长状态良好的对照组、LV-NC 组与 LV-胃饥饿素组的 MIN6 细胞,使用含低糖(3.3 mmol/L)或高糖(16.7 mmol/L)的 RPMI-1640 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中分别进行处理 1 h。取细胞培养上清液,3 400 r/min 离心 10 min 后按照胰岛素 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中的胰岛素含量。实验单独重复 3 次。

1.3.7 实时荧光定量 PCR:取 LV-胃饥饿素组、LV-NC 组及对照组 MIN6 细胞,采用 TRIzol 法提取待测细胞总 RNA,分光光度计检测纯度与浓度后,根据反转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:01116837)说明书反转录为 cDNA,反应体系:0.5  $\mu\text{g}$  RNA 模板,1  $\mu\text{L}$  引物,4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  反应缓释液,1  $\mu\text{L}$  RiboLock RNase 抑制剂,2  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP Mix,1  $\mu\text{L}$  RevertAid M-MuLVRT,无 RNA 酶水补充至 20  $\mu\text{L}$ 。再按照实时荧光 PCR 试剂说明书及预实验确定的反应时间与温度进行实时定量 PCR,反应体系为:10 pmol 引物、10  $\mu\text{L}$  2 $\times$  Taq Master Mix、3  $\mu\text{L}$  的 cDNA 模板和 10  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ ,共 25  $\mu\text{L}$  体系。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  (10 min)预变性后,变性 95 $^{\circ}\text{C}$  (7 s)  $\rightarrow$  退火 60 $^{\circ}\text{C}$  (20 s)  $\rightarrow$  72 $^{\circ}\text{C}$  (38 s),40 个循环周期。胃饥饿素上游引物:5'-GCAGCAGCGGCTTCACA-3',下游引物:5'-ACATCCAAACAGGAGCGTCAT-3';GAPDH 上游引物:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3',下游引物:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算胃饥饿素 mRNA 的相对表达水平。

1.3.8 蛋白质印迹实验:取方法 1.3.3 中的各组 MIN6 细胞,使用 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞 3 次,2 min/次,加入 RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂提取细胞中总蛋白。采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量,将蛋白样品加入 5 $\times$  上样缓冲液(体积比为 1:4),并于沸水中加热变性 10 min。取 30  $\mu\text{g}$  的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳以分离蛋白,采用湿转法将分离的蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,5% 的脱脂奶粉于室温下封闭 2 h 后,分别加入 Akt(1:500)、p-Akt(1:300)、Bax(1:800)、Cleaved-Caspase-3(1:800)、胃饥饿素(1:500)、GAPDH(1:1500)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜。洗涤缓冲液清洗 3 次,5 min/次,以 HRP 标记的二抗(1:5000)室温孵育 1 h,以洗涤缓冲液清洗 3 次,5 min/次。最后均匀滴加化学发光液发光液后,使用凝胶成像仪进行曝光拍照,Image J 软件测定条带灰

度值,以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。以上实验单独重复 3 次。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验;计数资料以例数或百分比表示,比较采用  $\chi^2$  检验。采用 Spearman 法分析胃饥饿素水平与相关检测指标间的相关性。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

表 1 两组孕产妇临床资料的比较

组别	$n$	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	分娩时孕周 ( $\bar{x} \pm s$ , 周)	空腹血糖 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	FINS ( $\bar{x} \pm s$ , mU/L)	HOMA-IR 指数 ( $\bar{x} \pm s$ )	脐带血葡萄糖 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	脐带血胰岛素 ( $\bar{x} \pm s$ , mU/L)
GDM	50	30.12 $\pm$ 2.17	37.12 $\pm$ 4.40	5.87 $\pm$ 0.49	10.37 $\pm$ 2.21	2.61 $\pm$ 0.32	4.22 $\pm$ 0.19	6.78 $\pm$ 0.26
对照组	50	29.30 $\pm$ 2.56	36.83 $\pm$ 5.21	4.24 $\pm$ 0.55	7.95 $\pm$ 1.76	1.46 $\pm$ 0.28	3.16 $\pm$ 0.20	5.04 $\pm$ 0.17
$t/\chi^2$ 值		1.728	0.301	15.647	6.057	19.124	27.171	39.607
$P$ 值		0.087	0.764	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	$n$	脐带血 HOMA-IR 指数( $\bar{x} \pm s$ )	产前体质指数 ( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	收缩压 ( $\bar{x} \pm s$ , mmHg)	舒张压 ( $\bar{x} \pm s$ , mmHg)	胎盘质量 ( $\bar{x} \pm s$ , g)	新生儿性别 (男性/女性, $n$ )	新生儿出生时 体重( $\bar{x} \pm s$ , g)
GDM	50	1.23 $\pm$ 0.14	21.43 $\pm$ 2.08	123.10 $\pm$ 5.21	82.14 $\pm$ 3.43	541.16 $\pm$ 74.23	27/23	523.50 $\pm$ 31.29
对照组	50	0.68 $\pm$ 0.15	21.08 $\pm$ 1.76	122.14 $\pm$ 5.69	81.09 $\pm$ 4.17	556.37 $\pm$ 62.08	24/26	533.10 $\pm$ 37.01
$t/\chi^2$ 值		18.954	0.908	0.880	1.375	1.111	0.360	1.401
$P$ 值		<0.001	0.366	0.381	0.172	0.269	0.548	0.165

2.2 两组孕产妇外周血和脐带血胃饥饿素水平 GDM 组外周血和脐带血胃饥饿素表达水平均低于对照组( $P < 0.05$ )。见表 2。Spearman 相关分析显示,对照组、GDM 组孕产妇外周血胃饥饿素表达水平均与脐带血胃饥饿素表达水平呈正相关( $r_s = 0.434$ ,  $P < 0.001$ ;  $r_s = 0.628$ ,  $P < 0.001$ )。

表 2 两组孕产妇外周血及脐带血胃饥饿素水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	$n$	外周血胃饥饿素	脐带血胃饥饿素
GDM 组	50	1 000.79 $\pm$ 352.11	37.15 $\pm$ 10.09
对照组	50	2 216.33 $\pm$ 481.02	59.26 $\pm$ 13.44
$t$ 值		14.419	9.303
$P$ 值		<0.001	<0.001

2.3 GDM 孕产妇外周血及脐带血胃饥饿素水平与糖代谢相关指标之间的相关性分析 Spearman 相关分析显示,GDM 孕产妇外周血胃饥饿素水平与空腹血糖、FINS 及 HOMA-IR 指数均呈负相关( $r_s = -0.481$ ,  $P < 0.001$ ;  $r_s = -0.352$ ,  $P = 0.036$ ;  $r_s = -0.412$ ,  $P < 0.001$ ),脐带血胃饥饿素水平亦与空腹血糖、FINS 及 HOMA-IR 均呈负相关( $r_s = -0.602$ ,  $P < 0.001$ ;  $r_s = -0.317$ ,  $P < 0.001$ ;  $r_s = -0.289$ ,  $P < 0.001$ )。

2.4 慢病毒感染后胰岛 B 细胞胃饥饿素 mRNA 及蛋白的表达 与对照组相比, LV-胃饥饿素组细胞的胃饥饿素 mRNA 与蛋白相对表达水平均增加

## 2 结果

2.1 两组孕产妇的临床资料比较 两组孕产妇的年龄、分娩时孕周、产前血压、产前体质指数、胎盘质量、新生儿体重、新生儿性别比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),而 GDM 组孕产妇的空腹血糖、FINS、HOMA-IR 指数、脐带血葡萄糖、脐带血胰岛素、脐带血 HOMA-IR 指数均高于对照组(均  $P < 0.05$ ),见表 1。

(均  $P < 0.05$ ),而 LV-NC 组细胞的胃饥饿素 mRNA 与蛋白相对表达水平的变化均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),见表 3 及图 1。

表 3 3 组胰岛 B 细胞胃饥饿素 mRNA 及蛋白的相对表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	胃饥饿素 mRNA	胃饥饿素蛋白
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.00	0.87 $\pm$ 0.53
LV-胃饥饿素组	3	2.44 $\pm$ 0.91 *	1.91 $\pm$ 0.42 *
LV-NC 组	3	0.95 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.31
$F$ 值		7.767	5.753
$P$ 值		0.022	0.040

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

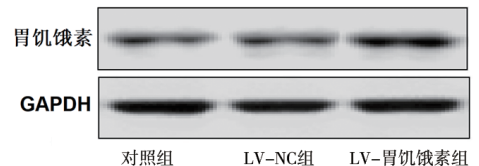


图 1 3 组胰岛 B 细胞中胃饥饿素蛋白的表达情况

2.5 过表达胃饥饿素对高糖诱导的胰岛 B 细胞增殖的影响 培养 48 h 时,与对照组相比,高糖组、高糖 + LV-NC 组及高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛 B 细胞增殖能力均降低( $P < 0.05$ );而与高糖组相比,高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛 B 细胞增殖能力增强( $P < 0.05$ ),高糖 + LV-NC 组的细胞增殖能力变化无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 4。

表4 4组胰岛B细胞增殖能力的比较( $\bar{x} \pm s$ , 吸光度值)

组别	n	12 h	24 h	36 h	48 h
对照组	5	0.27 ± 0.09	0.43 ± 0.16	0.62 ± 0.33	0.80 ± 0.07
高糖组	5	0.31 ± 0.13	0.35 ± 0.07	0.45 ± 0.08	0.51 ± 0.04*
高糖 + LV-NC 组	5	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.14	0.41 ± 0.10	0.46 ± 0.07*
高糖 + LV-胃饥饿素组	5	0.33 ± 0.16	0.39 ± 0.14	0.55 ± 0.09	0.64 ± 0.10**▲
F 值		0.220	0.658	1.363	21.581
P 值		0.881	0.590	0.290	<0.001

注:与对照组相比, \*P<0.05;与高糖组相比, #P<0.05;与高糖 + LV-NC 组相比, ▲P<0.05。

2.6 过表达胃饥饿素对高糖诱导的胰岛B细胞凋亡的影响 与对照组相比,高糖组、高糖 + LV-NC 组及高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛B细胞的凋亡率均降低(P<0.05);而与高糖组相比,高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛B细胞的凋亡率降低(P<0.05),高糖 + LV-NC 组的细胞凋亡率变化无统计学意义(P>0.05),见表5及图2。

表5 4组胰岛B细胞凋亡率的比较( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	凋亡率
对照组	3	6.22 ± 2.17
高糖组	3	28.51 ± 5.09*
高糖 + LV-NC 组	3	30.44 ± 7.16*
高糖 + LV-胃饥饿素组	3	15.90 ± 3.31**▲
F 值		16.710
P 值		0.001

注:与对照组相比, \*P<0.05;与高糖组相比, #P<0.05;与高糖 + LV-NC 组相比, ▲P<0.05。

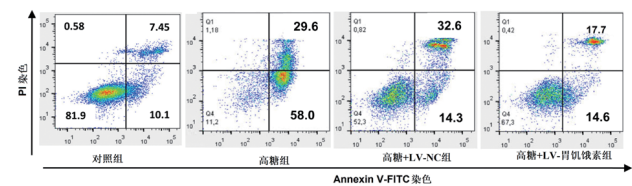


图2 4组胰岛B细胞的凋亡情况

2.7 过表达胃饥饿素对胰岛B细胞胰岛素分泌功能的影响 在低糖的条件下,低糖 + LV-胃饥饿素组的胰岛素释放能力较低糖组明显增加(P<0.05),而

表7 胰岛B细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白相对表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	p-Akt/Akt	Bax	Cleaved-Caspase-3
对照组	3	0.96 ± 0.02	0.87 ± 0.11	0.91 ± 0.18
高糖组	3	0.32 ± 0.14**	2.52 ± 0.20**	3.30 ± 0.51**
高糖 + LV-NC 组	3	0.29 ± 0.16**	2.47 ± 0.22**	3.25 ± 0.47**
高糖 + LV-胃饥饿素组	3	0.53 ± 0.09*	1.53 ± 0.14*	1.79 ± 0.56*
高糖 + LY294002 组	3	0.04 ± 0.06**	3.47 ± 0.41**	4.81 ± 0.27**
F 值		31.065	52.074	37.855
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, \*P<0.05;与高糖 + LV-胃饥饿素组相比, #P<0.05。

低糖 + LV-NC 组无明显改变(P>0.05);在高糖的条件下,高糖 + LV-胃饥饿素组的胰岛素释放能力亦较高糖组明显增加(P<0.05),而高糖 + LV-NC 组与高糖组差异无统计学意义(P>0.05),见表6。

表6 各组胰岛B细胞胰岛素含量( $\bar{x} \pm s$ , μg/mL)

组别	n	胰岛素
低糖组	3	3.21 ± 1.92
低糖 + LV-NC 组	3	2.85 ± 1.17
低糖 + LV-胃饥饿素组	3	7.06 ± 0.93*
F 值		8.279
P 值		0.019
高糖组	3	25.78 ± 7.64
高糖 + LV-NC 组	3	23.35 ± 9.42
高糖 + LV-胃饥饿素组	3	47.16 ± 9.42#
F 值		6.551
P 值		0.031

注:与低糖组相比, \*P<0.05;与高糖组相比, #P<0.05。

2.8 过表达胃饥饿素对高糖条件下胰岛B细胞中PI3K/Akt信号通路表达的影响 与对照组相比,高糖组、高糖 + LV-NC 组、高糖 + LV-胃饥饿素组及高糖 + LY294002 组胰岛B细胞的 p-Akt/Akt 蛋白比值(Akt磷酸化水平)降低,而 Bax 及 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达水平增加(P<0.05);与高糖组、高糖 + LV-NC 组和高糖 + LY294002 组相比,高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛B细胞的 Akt 磷酸化水平增加, Bax 及 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达水平降低(P<0.05),见表7及图3。

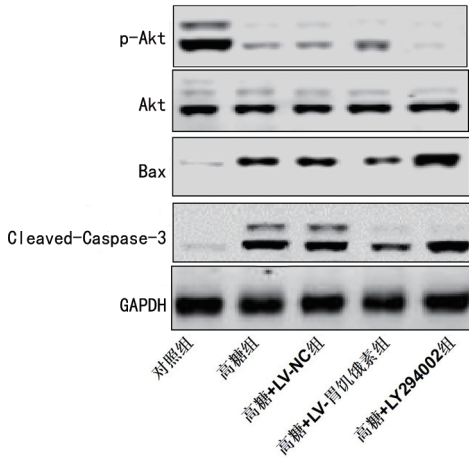


图3 各组胰岛 B 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达情况

### 3 讨论

近年来,胃饥饿素作为既往具有 GDM 病史患者发生 2 型糖尿病的重要危险因素而逐渐得到重视<sup>[13]</sup>。胃饥饿素是主要由人体胃肠消化系统分泌的一种生物性多肽,其在下丘脑、心脏、胰腺细胞、肺及胎盘组织等其他组织中也有少量表达<sup>[14-16]</sup>。在体内,胃饥饿素作为一种促进食欲的多肽,不仅能够促进食物的摄入和体重的增加,还能控制能量的代谢和胰岛素的分泌,因此胃饥饿素在胰岛素抵抗、肥胖及糖尿病等胰岛素相关疾病的发生中具有重要作用<sup>[17-18]</sup>。而关于胃饥饿素与 GDM 的关系,既往大量研究已证实,GDM 患者血清及胎盘组织中胃饥饿素的表达显著降低,且胃饥饿素水平与 GDM 患者的血糖、三酰甘油等糖脂代谢指标及 HOMA-IR 指数呈负相关<sup>[9-11]</sup>,但目前关于胃饥饿素在 GDM 患者脐带血中表达的研究甚少。

本研究结果显示,GDM 组外周血、脐带血胃饥饿素表达水平均低于对照组( $P < 0.05$ ),提示胃饥饿素可能参与 GDM 的发生,这与既往研究结果<sup>[10-11,19]</sup>相似。此外,对照组、GDM 组孕产妇外周血胃饥饿素表达水平均与脐带血胃饥饿素表达水平呈正相关( $P < 0.05$ ),这说明妊娠母体胃饥饿素水平变化可能影响胎儿体内胃饥饿素的表达。进一步分析胃饥饿素与糖代谢指标的相关性,结果显示 GDM 孕产妇外周血、脐带血中的胃饥饿素表达水平均与其空腹血糖水平、胰岛素水平及 HOMA-IR 指数呈负相关( $P < 0.05$ ),这表明胃饥饿素可能参与 GDM 患者及其胎儿的胰岛素抵抗,且能影响两者的血糖代谢过程。

研究显示,胰岛 B 细胞的数量减少及功能障碍与胰岛素抵抗、GDM、糖尿病等代谢相关性疾病的发生和发展具有密切关系<sup>[3,6-7]</sup>。因此,本研究通过体

外培养胰岛 B 细胞 MIN6,并通过慢病毒载体转染以过表达胃饥饿素,从而进一步明确高糖环境下过表达胃饥饿素对胰岛 B 细胞功能的影响。结果显示,与对照组相比,LV-胃饥饿素组细胞的胃饥饿素 mRNA 与蛋白表达水平均增加( $P < 0.05$ ),说明成功建立了过表达胃饥饿素的胰岛 B 细胞系。经高糖干预,高糖组的细胞增殖受到抑制,而凋亡率升高( $P < 0.05$ );但与高糖组相比,高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛 B 细胞增殖能力增强,凋亡率降低( $P < 0.05$ )。这提示过表达胃饥饿素能够明显减轻高糖对胰岛 B 细胞增殖能力的抑制及促凋亡作用。此外,ELISA 检测显示,在低糖或高糖条件下,过表达胃饥饿素的细胞的胰岛素释放能力均较低糖组或高糖组明显增加( $P < 0.05$ ),提示无论在低糖或高糖环境中,过表达胃饥饿素均能促进胰岛 B 细胞分泌胰岛素。上述实验结果表明,过表达胃饥饿素能够改善高糖环境对胰岛 B 细胞的功能损伤。

PI3K/Akt 信号通路是与糖代谢密切相关的信号传导途径之一,该信号通路在胰岛 B 细胞的生长、代谢、增殖、凋亡等过程中发挥重要的作用<sup>[20-21]</sup>。Akt 是表达于多种组织及细胞中的一种丝/苏氨酸激酶,有研究显示 Akt 经磷酸化激活后有助于胰岛 B 细胞抵抗脂毒性的损伤<sup>[22]</sup>。此外,有学者发现,脂肪酸能够通过抑制 Akt 的磷酸化水平诱导胰岛 B 细胞发生凋亡<sup>[23]</sup>。Bax 是分布于细胞质的重要促凋亡蛋白,其在接受上游传导的凋亡信号后被激活并发生分子构象的改变,随即诱发细胞的一系列改变,促进细胞凋亡。凋亡蛋白酶 Caspase-3 是各种凋亡途径的枢纽分子,也是细胞凋亡的指示剂,它的激活提示细胞已进入凋亡早期并最终发生细胞死亡<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,与高糖组与高糖 + LV-NC 组、高糖 + LY294002X 组相比,高糖 + LV-胃饥饿素组胰岛 B 细胞的 Akt 磷酸化水平增高,Bax 及 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ),提示过表达胃饥饿素能够显著促进高糖环境中胰岛 B 细胞的 Akt 磷酸化水平,并下调凋亡相关蛋白 Bax 与 Cleaved-Caspase-3 的表达;而预先使用 LY294002 处理细胞后,胰岛 B 细胞中 Akt 磷酸化水平的抑制作用更为显著,故凋亡相关蛋白 Bax 及 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平出现明显升高,这进一步提示促进 PI3K/Akt 信号通路的表达能有效保护胰岛 B 细胞。

综上所述,在 GDM 患者外周血及脐带血中胃饥饿素表达均降低,且其与血糖水平和胰岛素抵抗密切相关。过表达胃饥饿素能够通过促进 PI3K/Akt 信号通路的活化来改善高糖所致的胰岛 B 细胞损伤及功能障碍。

## 参 考 文 献

- [1] Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, et al. Gestational diabetes mellitus: an updated overview [J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40(9):899-909.
- [2] Sacks DA, Hadden DR, Maresh M, et al. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(3):526-528.
- [3] Johns EC, Denison FC, Norman JE, et al. Gestational diabetes mellitus: mechanisms, treatment, and complications [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(11):743-754.
- [4] Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(Suppl 2):S169-S174.
- [5] Guillén-Sacoto MA, Barquiel B, Hillman N, et al. Gestational diabetes mellitus: glycemic control during pregnancy and neonatal outcomes of twin and singleton pregnancies [J]. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*, 2018, 65(6):319-327.
- [6] Zhang H, Zhang J, Pope CF, et al. Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen [J]. *Diabetes*, 2010, 59(1):143-152.
- [7] Buchanan TA. Pancreatic B-cell defects in gestational diabetes: implications for the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(3):989-993.
- [8] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660.
- [9] Brink HS, van der Lely AJ, Delhanty PJD, et al. Gestational diabetes mellitus and the ghrelin system [J]. *Diabetes Metab*, 2019, 45(4):393-395.
- [10] Gómez-Díaz RA, Gómez-Medina MP, Ramírez-Soriano E, et al. Lower plasma ghrelin levels are found in women with diabetes-complicated pregnancies [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2016, 8(4):425-431.
- [11] 戴淑玲, 马丽, 修霞, 等. 妊娠期糖尿病孕妇血浆 Ghrelin 水平与胰岛素抵抗的研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(33):4855-4857.
- [12] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018:105-110.
- [13] Lappas M, Jinks D, Ugoni A, et al. Post-partum plasma C-peptide and ghrelin concentrations are predictive of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus [J]. *J Diabetes*, 2015, 7(4):506-511.
- [14] Kimber-Trojnar Z, Patro-Małysza J, Skórzyńska-Dziduszko KE, et al. Ghrelin in serum and urine of post-partum women with gestational diabetes mellitus [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):3001.
- [15] Jeon SG, Hong SB, Nam Y, et al. Ghrelin in Alzheimer's disease: pathologic roles and therapeutic implications [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55:100945.
- [16] Napolitano T, Silvano S, Vieira A, et al. Role of ghrelin in pancreatic development and function [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(Suppl 2):3-10.
- [17] Amitani M, Amitani H, Cheng KC, et al. The role of ghrelin and ghrelin signaling in aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7):1511.
- [18] Gray SM, Page LC, Tong J. Ghrelin regulation of glucose metabolism [J]. *J Neuroendocrinol*, 2019, 31(7):e12705.
- [19] Karakulak M, Saygili U, Temur M, et al. Comparison of umbilical cord ghrelin concentrations in full-term pregnant women with or without gestational diabetes [J]. *Endocr Res*, 2017, 42(2):79-85.
- [20] Bär L, Feger M, Fajol A, et al. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(22):5804-5809.
- [21] Kim SJ, Winter K, Nian C, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23):22297-22307.
- [22] Kharroubi I, Ladrrière L, Cardozo AK, et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11):5087-5096.
- [23] Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, et al. Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1) [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51):49676-49684.
- [24] Hassanein E, Shalkami AS, Khalaf MM, et al. The impact of Keap1/Nrf2, P<sub>38</sub> MAPK/NF-κB and Bax/Bcl2/caspase-3 signaling pathways in the protective effects of berberine against methotrexate-induced nephrotoxicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:47-56.

(收稿日期:2021-02-10 修回日期:2021-04-15)