

基础研究

RNA干扰特异性阻断胰岛局部血管紧张素II 1型受体对第一相胰岛素分泌的影响

易秋艳¹, 刘艳清², 张 珍², 刘春燕¹, 卢 斌¹, 邵加庆¹¹南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院内分泌科, 江苏 南京 210002; ²南方医科大学南京临床学院南京军区南京总医院内分泌科, 江苏 南京 210002

摘要:目的 观察 RNA 干扰技术阻断胰岛局部血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)表达后 db/db 小鼠胰岛第一相胰岛素分泌的变化并探讨其潜在机制。方法 分离 db/db 和 db/m 小鼠的胰岛并检测 AT1R mRNA 和蛋白的表达。构建针对小鼠 AT1R 基因的 RNA 干扰重组腺病毒(Ad-siAT1R)及含对照序列的重组腺病毒(Ad-siControl)。将分离培养的 db/db 小鼠胰岛细胞分为三组: Ad-siAT1R 感染组、Ad-siControl 感染组、空白对照组。腺病毒感染后继续培养胰岛细胞 72 h。检测各组 AT1R、GLUT-2 及葡萄糖激酶(GCK)的表达,并用胰岛灌注系统检测胰岛素动态分泌。结果 db/db 小鼠胰岛中 AT1R mRNA 和蛋白表达水平比 db/m 小鼠胰岛高 2 倍左右($P<0.05$)。腺病毒感染后, Ad-siAT1R 组较 Ad-siControl 组胰岛 AT1R mRNA 表达水平下降 75%,蛋白表达水平下降 65%,而 GLUT-2 及 GCK 表达水平分别升高 190%、121%(均 $P<0.05$)。胰岛灌注显示:空白对照组和 Ad-siControl 组小鼠的胰岛素第一相分泌显著下降,仅为基础水平的 1.8 倍;而 Ad-siAT1R 组在高糖负荷后 1~2 min 即达到最高峰值 140 mU/L,为基础水平的 2.8 倍,表明第一相胰岛素分泌明显改善。结论 RNA 干扰特异性阻断胰岛局部 AT1R 表达可上调 GLUT-2 及 GCK 表达,恢复第一相胰岛素分泌,这可能是 AT1R 阻滞剂改善胰岛分泌功能的机制之一。

关键词: RNA 干扰;肾素-血管紧张素系统;血管紧张素 II 1 型受体;第一相胰岛素分泌

Effect of small interfering RNA-mediated angiotensin II type 1 receptor knockdown on first-phase insulin secretion in isolated diabetic rat islets

YI Qiuyan¹, LIU Yanqing², ZHANG Zhen², LIU Chunyan¹, LU Bin¹, SHAO Jiaqing¹¹Department of Endocrinology, Nanjing Clinical Institute of Nanjing University, Nanjing 210002, China; ²Department of Endocrinology, Nanjing Clinical Institute of Southern Medical University, Nanjing 210002, China

Abstract: Objective To investigate the effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) knockdown on the first-phase insulin secretion in isolated islets of db/db mice and explore the possible mechanisms. **Methods** Islets were isolated from db/db and db/m mice and the expression level of AT1R in the islets was assayed. A recombinant adenovirus containing siRNA targeting AT1R (Ad-siAT1R) and a recombinant adenovirus with nonspecific siRNA (Ad-siControl) were constructed to infect the isolated islets for 72 h. AT1R, GLUT-2, and GCK expressions in the islets were investigated and islet perfusion was performed to evaluate the kinetics of insulin release. **Results** The expression level of AT1R in the isolated islets from db/db mice was twice that of islets from db/m mice. The islets treated with Ad-siAT1R showed significantly decreased AT1R mRNA and protein levels and significantly increased expression of GLUT-2 (by 190%) and GCK (by 121%) compared to those treated with Ad-siControl ($P<0.05$). In response to stimulation with 16.7 mmol/L glucose, the first-phase insulin secretion was impaired in both Ad-siControl group and mock infected group with the peak insulin levels only 1.8 times of the basal level; the first-phase insulin secretion was markedly improved in islets treated with Ad-siAT1R, with a peak insulin level reaching 2.8 times of the basal level. **Conclusions** In isolated islets of db/db mice, selective AT1R inhibition can restore the first phase insulin secretion by up-regulating GLUT-2 and GCK, which may be one of the potential mechanisms by which AT1R blockers improve insulin secretion function.

Key words: RNA interference; rennin-angiotensin system; angiotensin II type 1 receptor; first-phase insulin secretion

T2DM 患者在疾病早期就已存在胰岛β细胞功能受损,第一相胰岛素分泌障碍是其最早表现。改善胰岛

素第一时相分泌可更好控制餐后血糖,减轻血糖波动,保护胰岛β细胞功能,减少糖尿病并发症的发生^[1-2]。近年研究证实长期 AT1R 阻滞剂在体干预能减轻胰岛内氧化应激水平,增加胰岛内微血管数量和局部血流量,升高氧分压,从而改善第一相胰岛素分泌^[3-4]。我们前期研究发现坎地沙坦治疗减轻了胰岛β细胞含量的丢失,较大程度地改善了 db/db 糖尿病小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素分泌,但无法确定这些保护作用是源于胰岛局部

收稿日期:2014-12-22

基金项目:国家自然科学基金(81471018);江苏省医学重点人才项目(RC2011138);江苏省自然科学基金(BK2012781)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81471018).

作者简介:易秋艳,硕士研究生,E-mail: 357660675@qq.com

通信作者:邵加庆,博士,主任医师,副教授,硕士生导师,E-mail: shaojiaq@hotmail.com

RAS阻断还是全身RAS阻断^[5]。本研究采用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术抑制胰岛局部AT1R表达,观察其对第一相胰岛素分泌的影响,并探讨可能的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料

10只8周龄清洁级雌性C57BL/KsJ-db/db糖尿病小鼠及5只同周龄同窝出生的C57BL/KsJ-db/m非糖尿病小鼠(合格证号SCXX(苏)2007-0012)。总RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒、PCR引物合成(美国Invitrogen公司)。pSilencer 2.0载体购于美国Ambion公司。重组缺陷型腺病毒质粒pAdEasy-1系统、穿梭载体pAdTrack、BJ5183-AD-1感受态细菌、大肠杆菌Ecoli DH5a、空载腺病毒(Ad-siControl)以及包装细胞购于中科院上海细胞研究所。真核表达质粒pGCsi-U6-shRNA-AT1R由上海吉凯生物公司定制合成。小鼠抗AT1R抗体、GLUT-2抗体、GCK抗体、小鼠抗 β -actin抗体、辣根过氧化物酶耦联山羊抗小鼠IgG抗体(美国Santa Cruz公司)。小鼠胰岛素ELISA试剂盒(Morinaga, Yokohama, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 胰岛细胞的分离培养 将db/db和db/m小鼠依次苯巴比妥麻醉后夹闭胆总管十二指肠乳头开口,体视显微镜下行胆总管穿刺后注射1 mg/ml浓度的IV型胶原酶2 ml,逆行进入胰管使胰腺膨大后迅速分离胰腺,将胰腺置于含IV型胶原酶1 mg/ml的Hank's平衡液中消化40 min,去除胶原成份后多次振荡洗涤,显微镜下成功分离胰岛,镜下手检胰岛,每孔50个胰岛,每组所获得胰岛至少5孔,置于装有Hank's平衡液24孔板中于37℃、5% CO₂恒温箱孵育备用。

1.2.2 RT-PCR检测AT1R mRNA表达 用TRIzol试剂抽提两组胰岛细胞总RNA,参照逆转录试剂盒说明书逆转录为cDNA。AT1R上游引物5'-AGCTACAACAAGGCAAGG-3',下游引物3'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-5';内参基因 β -actin上游引物5'-TGTTGTCCC TGTATGCCTCTG行GTC-3',下游引物3'-ATGTCACGCACGATTTCCCTCTCA-5'。扩增条件:94℃预变性10 min,94℃30 s,53℃30 s,72℃1 min,共40个循环,72℃7 min。取PCR产物于2%琼脂糖行凝胶电泳,用BIORAD Flour-S MultilImager凝胶成像仪扫描并保存,并用凝胶成像分析系统测定灰度值,结果以AT1R条带密度占 β -actin条带密度的百分率表示。

1.2.3 INS-1细胞培养 INS-1细胞培养于RPMI 1640培养基中,加入10%(w/v)胎牛血清(GIBCO, Grand Island, NY)、11.1 mmol/L葡萄糖、10 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠以及50 μ mol/L β -

巯基乙醇,5% CO₂/95% 空气的37℃孵箱中培养,并每隔1~2 d换1次培养液,每周按1:3传代。在转染前两天将细胞接种入75 cm²无菌细胞培养瓶中,细胞浓度为每瓶4 $\times$ 10⁶个,当培养瓶中的细胞60%~70%汇合时进行转染。

1.2.4 shRNA的设计与筛选 根据GenBank中小鼠AT1R基因(基因序列号:NM-030985)的核苷酸序列,按照美国Ambion公司的网上设计软件设计产生3对shRNA序列,同时设计一对不针对靶基因对照序列siControl。从5'-3'末端,整个shRNA序列为BamH I酶切位点、19 nt正义序列、9 nt loop接头序列、19 nt反义序列、RNA聚合酶III终止子(TTT TTT)和Hind III酶切位点。分别合成并纯化每对编码shRNA及siControl的DNA模板单链,退火形成双链DNA,用T₄ DNA连接酶分别连接至pSilencer 2.0载体,利用阳离子脂质体转染至INS-1细胞,每5 μ g DNA转染6 $\times$ 10⁶个细胞。转染3 d后,检测INS-1细胞RNA和蛋白表达。最后选定的siAT1R针对的靶基因序列的5'末端相对于起始密码子对应于小鼠AT1R核苷酸540(GCGTCTTTCTTCTCAATCT)。

1.2.5 重组腺病毒的构建 由生物公司合成针对小鼠AT1R mRNA的特异性siRNA真核表达质粒psiRNA-AT1R;双酶切得到siRNA-AT1R表达片段;插入穿梭载体pAdTrack上,获得转移质粒pAdTrack-siRNA-AT1R;后者经线性化后,转化含有腺病毒骨架质粒pAdEasy-1的大肠杆菌BJ5183进行同源重组;Pac I酶切鉴定,筛选出正确重组腺病毒质粒pAdEasy-siRNA-AT1R;酶切线性化后转染293细胞包装成重组病毒Ad-siAT1R,荧光显微镜观察绿色荧光表达,行PCR鉴定。通过反复感染扩增病毒,采用氯化铯密度梯度离心法纯化重组腺病毒。以同样方法扩增空载病毒Ad-siControl至相当量,并纯化。获得约3.6 $\times$ 10⁹ pfu/ml滴度的重组腺病毒Ad-siAT1R和2.9 $\times$ 10⁹ pfu/ml滴度的空载病毒Ad-siControl。

1.2.6 腺病毒感染胰岛细胞 db/db小鼠胰岛过夜培养24 h后分为3组处理:(1)Ad-siAT1R感染组:按MOI为100(每个胰岛按含2000个细胞计算),将Ad-siAT1R病毒液加入胰岛细胞,隔30 min轻轻晃动,共计20 h;(2)Ad-siControl感染组:按照前述方法,用Ad-siControl病毒液感染胰岛细胞;(3)空白对照组:同等条件下培养未行任何干预处理的胰岛细胞。将病毒液从胰岛细胞移除后,继续培养72 h,每24 h换1次培养液。检测各组葡萄糖刺激的胰岛素分泌(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)水平,随后收集各组胰岛,检测各组AT1R, GLUT-2,以及GCK的表达。

1.2.7 胰岛灌注 将离体胰岛灌注系统置于37℃水浴,并将微量泵输注系统与其连接。将预先配置好

的含 2.8 mmol/L 葡萄糖的 KRB 溶液 (129 mmol/L NaCl, 5 mmol/L NaHCO₃, 4.8 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.2 mmol/L MgSO₄, 0.2% BSA, 10 mmol/L Hepes, 2.5 mmol/L CaCl₂, 2.8 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4) 充填至整个管道系统, 在层析柱中加入 100 μ l 预先配置好的葡聚糖凝胶, 静置 5 min, 然后将每组 50 个胰岛转移至层析柱, 静置 5 min, 再加入 100 μ l 葡聚糖凝胶, 盖紧硅胶塞密闭胰岛舱, 然后将胰岛舱包括整个管道系统全部浸入 37 $^{\circ}$ C 水浴。连接微量泵, 开始 2.8 mmol/L KRB 0.5 ml/h 速度灌注 1 h, 后换为 16.7 mmol/L KRB 1 ml/h。以开始 16.7 mmol/L KRB 灌注为 0 时间点, 在灌注前 30、20、10 min 和灌注后 0、20、40、60、80、100 s 以及 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30 min 时收集灌注出的液体, -80 $^{\circ}$ C 保存, 胰岛素测定使用小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒, 胰高血糖素测定使用小鼠胰高血糖素 ELISA 试剂盒, 根据测得的浓度绘制其动态分泌曲线。

1.2.8 Western blot 检测各组胰岛 AT1R、GLUT-2, 以及 GCK 的表达 按公司说明操作步骤抽提各组细胞蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 NC 膜, BSA 室温封闭 1 h, TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min, 用

到的抗体主要有小鼠抗 AT1R 抗体、抗 GCK 抗体及抗 GLUT-2 抗体, 4 $^{\circ}$ C 抗孵育过夜, 同前法洗膜 3 次, 室温下相应加入辣根过氧化物酶耦联山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:2000) 孵育 2 h。用增强化学发光法显色, X 片曝光显影, 同时用同样方法对上述样品用抗鼠的 β -actin 单克隆抗体免疫杂交与显色作为内参对照, 凝胶成像分析系统摄像分析。

1.3 统计学分析

所有数值均表示为均数 $\pm$ 标准差。所有统计分析均使 SPSS11.0 软件。组间比较采用独立 *t* 检验或单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 db/db 和 db/m 小鼠胰岛 AT1R、GLUT-2, 以及 GCK 的表达

与 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠胰岛 AT1R mRNA 及蛋白的表达水平升高 2 倍左右, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1); 而 GLUT-2 和 GCK 表达水平分别下降 65.8% 和 62.7% (图 2), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 db/db 小鼠 AT1R 存在过度表达, 而 GLUT-2 和 GCK 表达明显受损。

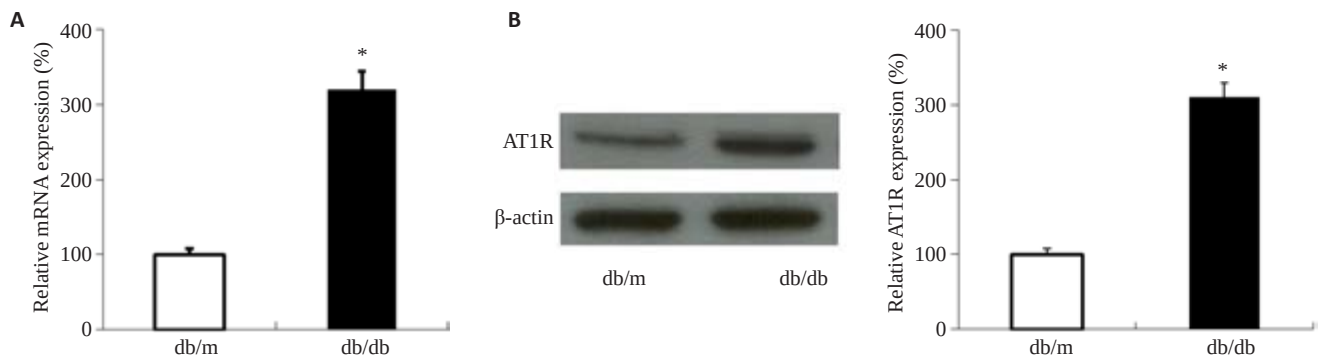


图 1 db/m 小鼠和 db/db 小鼠胰岛 AT1R 的表达

Fig.1 Expression levels of AT1R mRNA (A) and protein (B) in islets of db/m mice and db/db mice. * $P < 0.05$ vs db/m group.

2.2 腺病毒感染后各组小鼠胰岛 AT1R、GLUT-2, 以及 GCK 的表达

腺病毒感染后, Ad-siControl 组和空白对照组之间 AT1R 的表达差异无统计学意义。Ad-siAT1R 组 AT1R mRNA 表达水平较 Ad-siControl 组下降 75%, 蛋白表达水平下降 65%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 RNA 特异性干扰成功抑制了胰岛局部 AT1R 表达 (图 3)。与此同时, Ad-siAT1R 组 GLUT-2 和 GCK 表达水平较 Ad-siControl 组分别升高 190% 和 121% (均 $P < 0.05$), 提示 db/db 小鼠胰岛 AT1R 表达水平下调后, 胰岛 β 细胞的 GLUT-2 和 GCK 表达明显升高 (图 4)。

2.3 胰岛素动态分泌

低糖灌注时, 各组小鼠体外胰岛的胰岛素分泌水平无明显差异。高糖刺激后, 空白对照组和 Ad-siControl 组的胰岛素分泌水平均出现一定程度升高, 最高峰值 90 mU/L 左右, 仅达到基础水平 1.8 倍。而 Ad-siAT1R 组的胰岛素分泌在给予 16.7 mmol/L 葡萄糖后 1~2 min 即达到最高峰值 140 mU/L, 为基础水平的 2.8 倍, 与 Ad-siControl 组相比差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 表明 RNA 干扰特异性抑制胰岛局部 AT1R 表达后, db/db 小鼠胰岛的第一相胰岛素分泌显著改善 (图 5)。

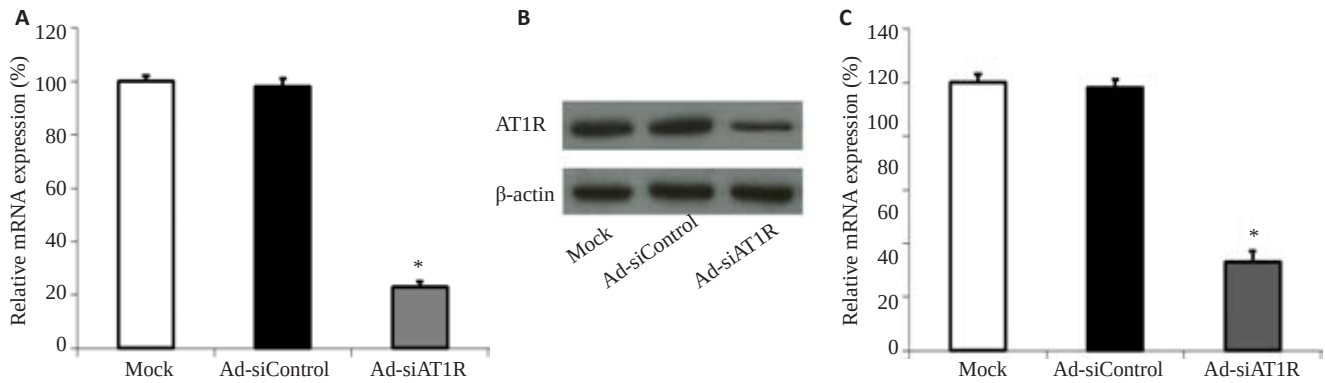


图2 AT1R基因沉默对AT1R表达的影响

Fig.2 Effects of AT1R silencing on AT1R expression. A: AT1R mRNA expression in islets of db/db mice transfected with Ad-si AT1R, Ad-siControl, or Mock (* $P<0.05$ vs Ad-siControl); B: Western blotting result of AT1R protein; C: AT1R protein expression in islets of db/db mice transfected with Ad-si AT1R, Ad-siControl, or Mock (* $P<0.05$ vs Ad-siControl).

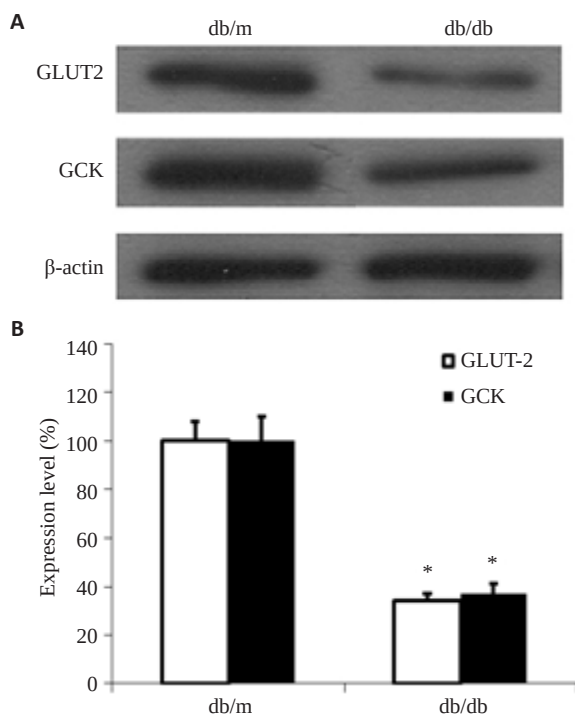


图3 db/m小鼠和db/db小鼠离体胰岛GLUT-2和GCK的表达

Fig.3 Expression of GLUT-2 and GCK protein in islets of db/m mice and db/db mice. * $P<0.05$ vs db/m group. A: Western blotting; B: GLUT-2 and GCK protein expression in islets of db/db mice and db/db mice (* $P<0.05$ vs db/m group).

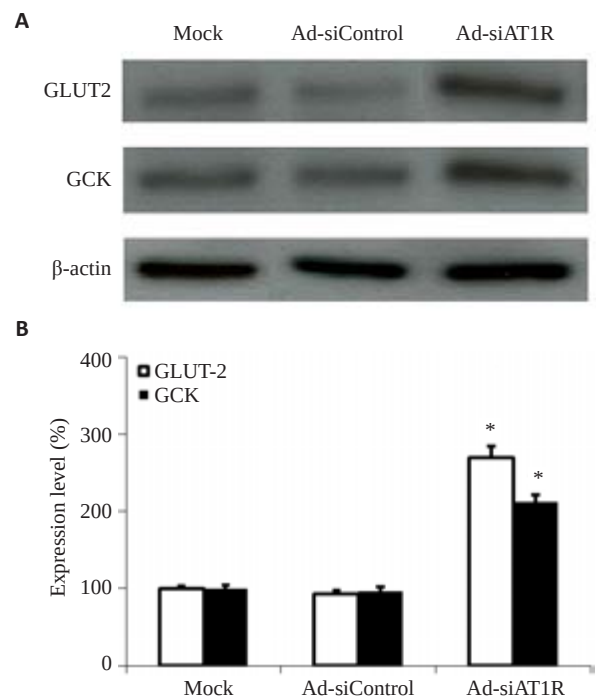


图4 AT1R基因沉默对GLUT-2和GCK表达的影响

Fig.4 Effects of AT1R silencing on GLUT-2 and GCK expression. A: Western blotting; B: GLUT-2 and GCK protein expression in islets of db/db mice transfected with Ad-siAT1R, Ad-siControl, or Mock (* $P<0.05$ vs Ad-siControl group).

3 讨论

近年研究发现胰岛局部存在独立的RAS系统,血管紧张素II(angiotensin II, Ang II) AT1和AT2受体、血管紧张素转化酶、血管紧张素原均在小鼠胰岛中表达,实时RT-PCR、western blot和二重荧光染色更证实AT1R特定地在胰岛β细胞表达^[6]。高血糖可以剂量依赖的方式上调胰岛RAS系统各组分表达,亦有动物实验结果证实糖尿病小鼠胰岛细胞AT1R表达水平明显

升高^[7-8]。本次实验结果与此一致,db/db小鼠胰岛AT1R mRNA及蛋白的表达水平显著升高,约为db/m小鼠的3倍左右。

胰岛β细胞AT1R表达对胰岛功能可能有重要影响。AT1R阻滞剂替米沙坦长期干预治疗可下调高质饮食下胰岛炎症因子IL-1β表达,降低转录因子NF-κB百分比,降低解偶联蛋白-2(UCP-2)诱导的氧化应激,减轻内质网应激,最终减缓β细胞凋亡进而

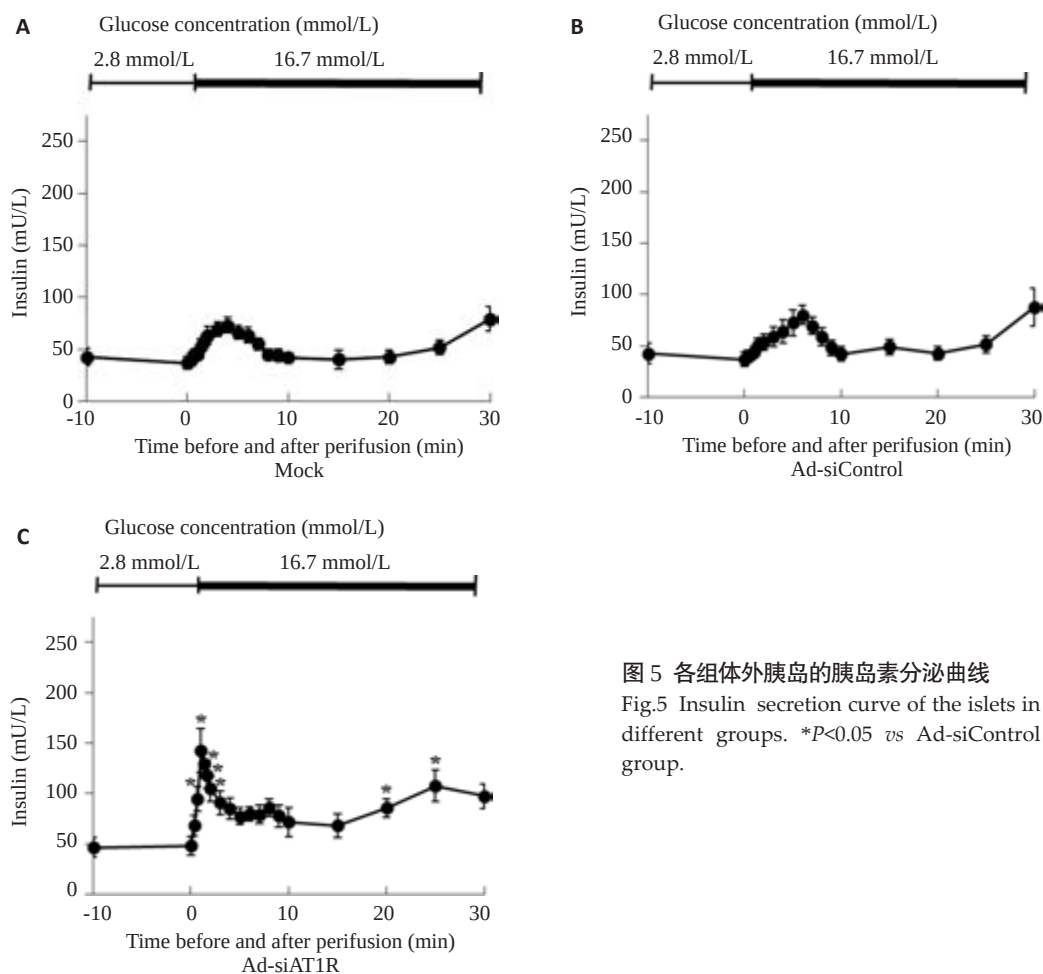


图5 各组体外胰岛的胰岛素分泌曲线

Fig.5 Insulin secretion curve of the islets in different groups. * $P < 0.05$ vs Ad-siControl group.

改善胰岛素分泌^[9]。洛沙坦可减轻AT1R诱导的磷脂酶C-三磷酸肌醇- Ca^{2+} 信号通路对 β 细胞胰岛素分泌的损伤^[10]。我们前期研究亦发现AT1R阻滞剂治疗能够改善胰岛局部血供,减轻胰岛内氧化应激,增加胰岛细胞数量并改善胰岛素第一相分泌^[5,11]。以上研究结果显示全身RAS阻断可不同程度保护胰岛分泌功能,但胰岛局部AT1R的表达对胰岛分泌功能有无直接调节作用尚不清楚。鉴于此,我们采用RNA干扰技术抑制离体db/db小鼠胰岛 β 细胞特异性AT1R表达,观察 β 细胞AT1R阻断后胰岛分泌功能有无变化。实验结果显示,腺病毒感染后Ad-siAT1R组AT1R表达水平显著降低,与此同时,第一相胰岛素分泌明显改善,峰值升高至140 mU/L,为基础水平的2.8倍,提示 β 细胞高表达的AT1R可直接损害胰岛素分泌功能。

但AT1R抑制 β 细胞胰岛素分泌的机制尚不清楚。有研究发现,AT II诱导的氧化应激可降低PI3K的活性,抑制其下游信号如AKT2介导的GLUTs的转运以及其他葡萄糖感受器的表达,减少胰岛素分泌^[12]。GLUT2和GCK是 β 细胞最重要的葡萄糖感受器。血糖升高超过正常范围时GLUT2将葡萄糖转运

至胰岛 β 细胞中,继而由GCK磷酸化进入糖酵解及氧化过程,结果使ATP/ADP的比值增加,细胞内 K^{+} 通道关闭,细胞膜去极化, Ca^{2+} 通道开放,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,存储胰岛素的囊泡与质膜融合,胰岛素释放至胞外^[13]。胰岛 β 细胞GLUT2、GCK表达水平与胰岛分泌功能密切相关,GCK表达缺陷的 β 细胞需要更高的血糖浓度刺激才能启动胰岛素分泌,恢复GCK表达后可逆转这一现象,上调胰岛 β 细胞GLUT2表达水平亦可显著改善 β 细胞胰岛素分泌功能^[14-15]。为此我们观察了腺病毒感染前后胰岛细胞GLUT-2及GCK表达变化情况。结果显示,抑制胰岛 β 细胞AT1R表达后,GLUT-2及GCK表达水平明显升高,同时伴有第一相胰岛素分泌显著改善。因此我们推测,糖尿病状态下胰岛局部高浓度的Ang II与 β 细胞过度表达的AT1R受体结合后,可通过降低GLUT-2及GCK表达水平,削弱胰岛 β 细胞第一相胰岛素分泌。

综上所述,本研究证实胰岛 β 细胞表达的AT1R与其胰岛素分泌功能密切相关,阻断 β 细胞AT1R可升高GLUT2和GCK的表达水平,显著改善胰岛素第一相分泌,这可能是AT1R拮抗剂改善胰岛分泌功能的机制之一。

参考文献:

- [1] Ceriello A, Esposito K, Piconi L, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1349-54.
- [2] Hu Y, Liu W, Huang R, et al. Postchallenge plasma glucose excursions, carotid intima-media thickness, and risk factors for atherosclerosis in Chinese population with type 2 diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(1): 302-6.
- [3] 邵加庆, 顾 萍, 杜 宏, 等. 替米沙坦对db/db小鼠胰岛内微血管结构的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12(8): 726-8.
- [4] Kampf C, Lau T, Olsson R, et al. Angiotensin II type 1 receptor inhibition markedly improves the blood perfusion, oxygen tension and first phase of glucose-stimulated insulin secretion in revascularised syngeneic mouse islet grafts[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(6): 1159-67.
- [5] Shao J, Iwashita N, Ikeda F, et al. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4): 1224-33.
- [6] Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas[J]. *J Physiol*, 2007, 580(Pt 1): 31-7.
- [7] Härdner C, Mörke C, Walther R, et al. High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β -cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 795-804.
- [8] Chu KY, Lau T, Carlsson PO, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2006, 55(2): 367-74.
- [9] Yuan L, Li X, Li J, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on the islet morphology and function in rats with long-term high-fat diet[J]. *Acta Diabetol*, 2013, 50(4): 479-88.
- [10] Madec AM, Cassel R, Dubois S, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway[J]. *FASEB J*, 2013, 27(12): 5122-30.
- [11] Shao JQ, Iwashita N, Du H, et al. Angiotensin II receptor blocker provides pancreatic beta-cell protection Independent of blood pressure lowering in diabetic db/db mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(2): 246-57.
- [12] Kasper SO, Phillips EE, Castle SM, et al. Blockade of the Renin-Angiotensin system improves insulin receptor signaling and insulin-stimulated skeletal muscle glucose transport in burn injury [J]. *Shock*, 2011, 35(1): 80-5.
- [13] Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion[J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(9): 742-50.
- [14] Hua H, Shang L, Martinez H, et al. iPSC-derived β cells model diabetes due to glucokinase deficiency[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3146-53.
- [15] Gu J, Li W, Xiao D, et al. Compound K, a final intestinal metabolite of ginsenosides, enhances insulin secretion in MIN6 pancreatic β -cells by upregulation of GLUT2[J]. *Fitoterapia*, 2013, 87: 84-8.

(编辑:吴锦雅)