

急性高血糖影响小鼠第一时相胰岛素分泌的机制

赵一楠,周迎生*,颜迪恩,高秀莹

(首都医科大学附属北京安贞医院内分泌代谢科,北京 100029)

【摘要】 目的 观察急性高血糖影响小鼠第一时相胰岛素分泌的功能及形态学变化特点。**方法** 给 C57/BL 6J 小鼠完成颈静脉插管后输注 20% 高糖溶液 4 h,建立急性糖毒性小鼠模型,行腹腔葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)及口服葡萄糖耐量实验(oral glucose tolerance test, OGTT)评价葡萄糖耐量及胰岛素分泌功能。HE 染色及电镜观察胰岛形态变化及细胞内胰岛素分泌颗粒亚细胞结构变化。**结果** IPGTT 实验中急性糖毒性组 15 min 血糖值较对照组显著增加[(10.3 ± 0.33) mmol/L vs (19.3 ± 1.66) mmol/L],上升 87% ($P < 0.05$),OGTT 实验中 30 min 血糖值较对照组显著增加[(9.8 ± 0.31) mmol/L vs (18.16 ± 1.01) mmol/L],升高 85% ($P < 0.05$),且早期胰岛素分泌高峰受损且分泌延迟。GSIS 实验中急性糖毒性组在基础状态时(葡萄糖浓度 2.8 mmol/L)和高糖(16.7 mmol/L)刺激后,胰岛素分泌较对照组显著降低[(0.481 ± 0.003) ng/mL vs (0.702 ± 0.121) ng/mL, (2.43 ± 0.03) ng/mL vs (4.07 ± 0.34) ng/mL],分别下降 46% 和 67% ($P < 0.05$);胰岛素含量测定结果显示,急性糖毒性组比对照组降低[(97.01 ± 2.05) ng/mL vs (65.12 ± 0.42) ng/mL, (121.40 ± 0.58) ng/mL vs (62.7 ± 0.48) ng/mL],下降 49% 和 94% ($P < 0.05$)。HE 染色显示急性糖毒性胰岛边界不规则、内部细胞排列不整;透射电镜可见细胞内胰岛素分泌颗粒空泡,线粒体嵴断裂。**结论** 急性葡萄糖毒性使胰岛 β 细胞内胰岛素储备减少,导致第一时相分泌胰岛素峰值降低及延迟。

【关键词】 胰岛;急性高血糖试验;糖耐量试验;胰岛素分泌;组织学;超微结构;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 05-0479-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.05.003

Impairment mechanisms of acute hyperglycemia in the first-phase insulin secretion in mouse

ZHAO Yi-nan, ZHOU Ying-sheng*, YAN Di-en, GAO Xiu-ying

(Department of Metabolism and Endocrinology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To clarify the impairment mechanisms of acute hyperglycemia in the first-phase insulin secretion in mice. **Methods** The mouse model of acute glucose toxicity was established by glucose infusion through jugular vein catheterization. The glucose and insulin levels were assessed by IPGTT and OGTT in the mice of acute hyperglycemia and control groups. The histology of pancreatic islets was observed using HE staining and the insulin granules and other cytoplasmic organelles were observed by electron microscopy. **Results** The mouse model of acute hyperglycemia was successfully established. The IPGTT showed that the blood glucose level was decreased by 87% (10.3 ± 0.33 mmol/L vs. 19.3 ± 1.66 mmol/L) at 15 min in the acute hyperglycemia group compared with the control group. The OGTT showed that the blood glucose level was decreased by 85% (9.8 ± 0.31 mmol/L vs. 18.16 ± 1.01 mmol/L) at 30 min in the acute hyperglycemia group compared with the control group. However, the peak values of insulin secretion were delayed in both IPGTT and OGTT. Insulin levels at 2.8 and 16.7 mmol/L glucose stimulation in the acute hyperglycemia group was de-

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81641027);教育部留学回国基金资助项目(2012-940);北京市科委科研基金资助项目(Z131100004013044);北京市学科带头人基金资助项目(2013-2-006)。

【作者简介】 赵一楠(1988-),男,在读博士生,专业:内分泌与代谢疾病。E-mail: zhaoyinan1988@163.com

【通讯作者】 周迎生(1965-),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:2型糖尿病发病机制及心血管并发症防治。E-mail: yszhou@ccmu.edu.cn

clined by 46% and 67% than the control group, respectively ($P < 0.05$). Residual insulin content in islet β cells was declined by 49% at 2.8 mmol/L and 94% at 16.7 mmol/L glucose infusion than the control group ($P < 0.05$). The histology showed irregular structure of pancreatic islets in the acute hyperglycemia group. The electron microscopy revealed that the amount of insulin granules was decreased, and more cytoplasmic vacuoles and swollen mitochondria were observed.

Conclusions Acute intravenous glucose load decreases insulin content of islet β cells, leading to decrease and delay of the first-phase insulin secretion.

[Key words] Acute hyperglycemia; Pancreatic islets; Glucose tolerance test; Insulin secretion; Histology; Ultra-structure; Mouse

Corresponding author: ZHOU Ying-sheng, yszhou@cemu.edu.cn

胰岛素分泌功能障碍或胰岛素缺乏是糖尿病发病的重要原因,早期表现在胰岛素第一时相分泌功能的异常^[1]。静脉输注葡萄糖液、大量饮用含糖饮料、使用类固醇激素和应激性因素等是引起血糖迅速升高的常见诱因^[2]。研究表明,血糖浓度超过生理范围对细胞、组织有损害作用,称糖毒性,当血糖升高不能刺激足够的胰岛素释放就会发生糖尿病^[3,4]。我们既往研究发现急性糖毒性可以损伤胰岛素第一时相分泌,形态学研究发现胰岛内部细胞排列不整齐且外部形态不规则,胰岛素染色分布不均匀且颜色程度不一致^[5]。本研究拟通过建立急性糖毒性损伤模型,探索急性糖毒性影响胰岛素分泌的功能及形态学机制特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF/VAF 级 C57BL/6J 小鼠为 12 周龄,雄性,30 只,体重 24 ~ 26 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2016-0011】,首都医科大学附属北京安贞医院心肺血管病研究所实验动物科学部【SYXK(京)2016-0027】完成小鼠饲养及部分相关实验内容。动物正常饮食、进水,饲养环境安静、舒适,12/12 h 昼夜规律,饲养温度恒定在 22℃ ~ 26℃,空气湿度维持在 60% ~ 70%。所有饲养小鼠均完成高葡萄糖钳夹实验模型。本实验分为两组,每组 15 只;(1)正常对照组(control group),颈静脉输注生理盐水;(2)急性糖毒性组(acute hyperglycemia group),颈静脉输注 20% 葡萄糖。

1.2 建立急性葡萄糖毒性模型

将小鼠称重、编号,并根据体重按 80 mg/kg 注射 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉小鼠。在颈静脉插管术后恢复 3 d。实验时通过鼠尾静脉测定小鼠血糖,在颈静脉插管内注射肝素盐水(200 U/mL)抗凝,将颈静脉插管连接微量注射泵(Perfusor[®] compact,

BRAUN),按照起始速度 0.5 mL/h 输注 20% 葡萄糖溶液,血糖在输注 10 min 后达到 16.7 mmol/L,继续输注,每 30 min 测定血糖 1 次,据血糖浓度调节输注速度,保持血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L,输注 4 h 后复测血糖,整个过程中小鼠处于麻醉状态。实验结束待观察小鼠恢复后再送回动物房,正常饮食。

1.3 葡萄糖耐量试验(GTT)

腹腔葡萄糖耐量试验(IPGTT)时,小鼠禁食过夜 10 h 以上。通过鼠尾静脉测定空腹血糖,给予腹腔注射 20% 葡萄糖(2 g/kg),用固定器固定小鼠,分别测定葡萄糖负荷后 15、30、60、120 min 血糖,用毛细采血管(Roche)在各时间点鼠尾采血。血标本经 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min 取上清,放入 -80℃ 冰箱内保存。口服葡萄糖耐量试验(OGTT)时,小鼠禁食过夜 10 h 以上。通过鼠尾静脉测定空腹血糖,给予口服 20% 葡萄糖(2 g/kg)灌喂,用固定器固定小鼠,分别测定葡萄糖负荷后 30、60、90、120 min 血糖,并留取各时间点血标本,离心、取上清后放入 -80℃ 冰箱保存^[6]。上述实验在不同小鼠中分别完成。

1.4 胰岛素浓度测定

采用小鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒(Alpco 公司,USA)测定。从 -80℃ 冰箱中取出样本,放置至室温,涡旋混匀 5 s,按照既往研究中方法测定胰岛素浓度^[7]。

1.5 胰腺组织 HE 染色

胰腺组织脱水后石蜡包埋,包埋时注意组织切面向下并沉至石蜡底部。石蜡切片制备:将包埋好的石蜡包埋盒保存在 -20℃ 冰箱内,切片前取出放置在冰上,切片厚度 6 μ m,切片刀尽量从左向右顺序切片,切片前用 30% 乙醇湿润组织部分以防止组织碎裂,展片时间 2 ~ 3 s 即可。放置在 80℃ 烤片箱内 100 min,用以防止组织脱片。此后,石蜡切片还需脱蜡、染色。

胰腺组织在切片制备及染色过程中不同于其他实质脏器(心脏、肝、肾),组织形状不规则,脱水后质地较硬、较脆。切片及展片时组织容易出现碎裂、卷曲,故切片时尽量保证低温、湿润,展片时间不宜过长。HE 染色过程中染料作用时间不宜过长,可在每次染色操作完成后于立式显微镜下观察染色情况。

1.6 小鼠胰岛的分离、纯化

麻醉后固定小鼠于鼠板上,酒精消毒胸腹部,将腹腔内脏器钝性分离,充分暴露十二指肠及周围胰腺,按照既往研究中分离方法获得胰岛^[8]。

1.7 葡萄糖刺激的胰岛素分泌实验(GSIS)

挑选过夜培养的胰岛移入含有 6 mL KRBH 液(0.5% BSA)的培养皿中,于 37℃ CO₂ 培养箱中预孵育 1 h。体视显微镜下,吸取包膜完整、大小一致的胰岛种于 24 孔板,每孔 10 个,加入含不同浓度葡萄糖的刺激液,每孔 2 mL,每个浓度设 3 个复孔,置于 37℃ CO₂ 培养箱孵育 1 h。取出 24 孔板,置于冰上 10 min,以终止胰岛素分泌。体视显微镜下,吸取上清 1 mL 至 1.5 mL EP 管中(避免吸入胰岛),按照既往研究中的方法完成小鼠胰岛素分泌实验^[7,8]。

1.8 小鼠胰岛透射电镜

将分离挑选出的 200 个胰岛用 3% 戊二醛固定液固定 2 h,使其蛋白结构保存良好并失去活性。用 0.1 mol/L PB 缓冲液对组织清洗 3 次后,采用琼脂胶进行第 1 次包埋,使胰岛在琼脂中呈悬浮状态。

在首都医科大学电镜室,用 1% 锇酸对胰岛进行后固定、脱水、包埋、聚合、电子染色。用透射电镜(日本 JEOL JEM-1400)观察胰岛 β 细胞胰岛分泌颗粒及亚细胞结构。

1.9 统计学处理

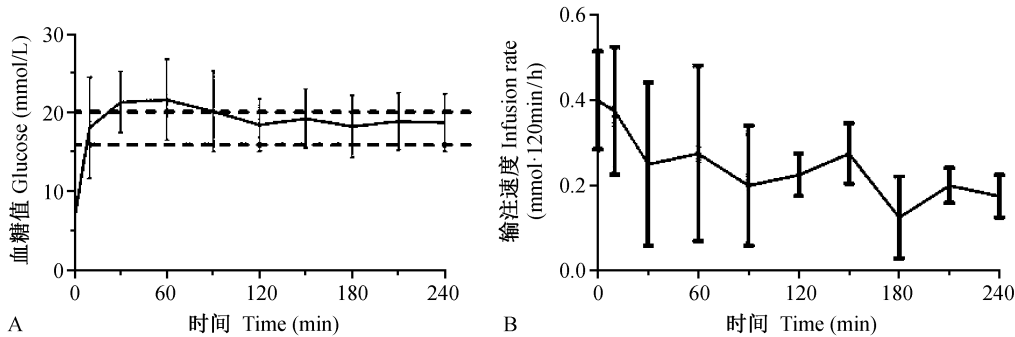
正态分布数据用均值 ± 标准误表示,两组均数比较采用 *t* 检验,多组间比较为单因素方差分析或 LSD 检验。非正态分布数据用中位数及四分位法表示,组间比较采用非参数检验。计数资料用率表示,采用卡方检验分析。应用 SPSS 软件进行数据统计学分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立急性糖毒性小鼠模型

本研究通过对小鼠右颈静脉插管后正常食水恢复 3 d,使用微量注射泵持续输注高糖,将血糖维持在 16.7 mmol/L 以上 4 h,起始输注速度为 0.5 mL/h,输注 10 min 后测定血糖值,根据血糖上升情况,调节输注速度,2 h 后输注速度基本为 0.2 mL/h 左右,输注结束后监测血糖恢复情况,通常 0.5 h 内小鼠血糖恢复至术前水平,详见图 1。

本实验中小鼠共 30 只,操作成功 24 只,死亡 6 只。死亡原因主要包括:手术操作中出血、插管时产生血栓。每组 12 只小鼠,其中 6 只完成 IPGTT 实验,另外 6 只完成 OGTT 实验,并记录数据,每组取 3 只小鼠胰腺组织完成 HE 染色,6 只分离胰岛并完成体外实验,3 只小鼠取胰岛组织完成透射电镜。



注:A. 为 4 h 内小鼠静脉血糖值变化;B. 为微量注射泵输注速度变化。

图 1 4 h 输糖过程中小鼠血糖及输注速度变化

Note. A, changes of blood glucose levels in the mice within 4 hours; B, changes of infusion dosing rate in the mice within 4 hours.

Fig. 1 Changes of blood glucose and infusion dosing rate in the mice

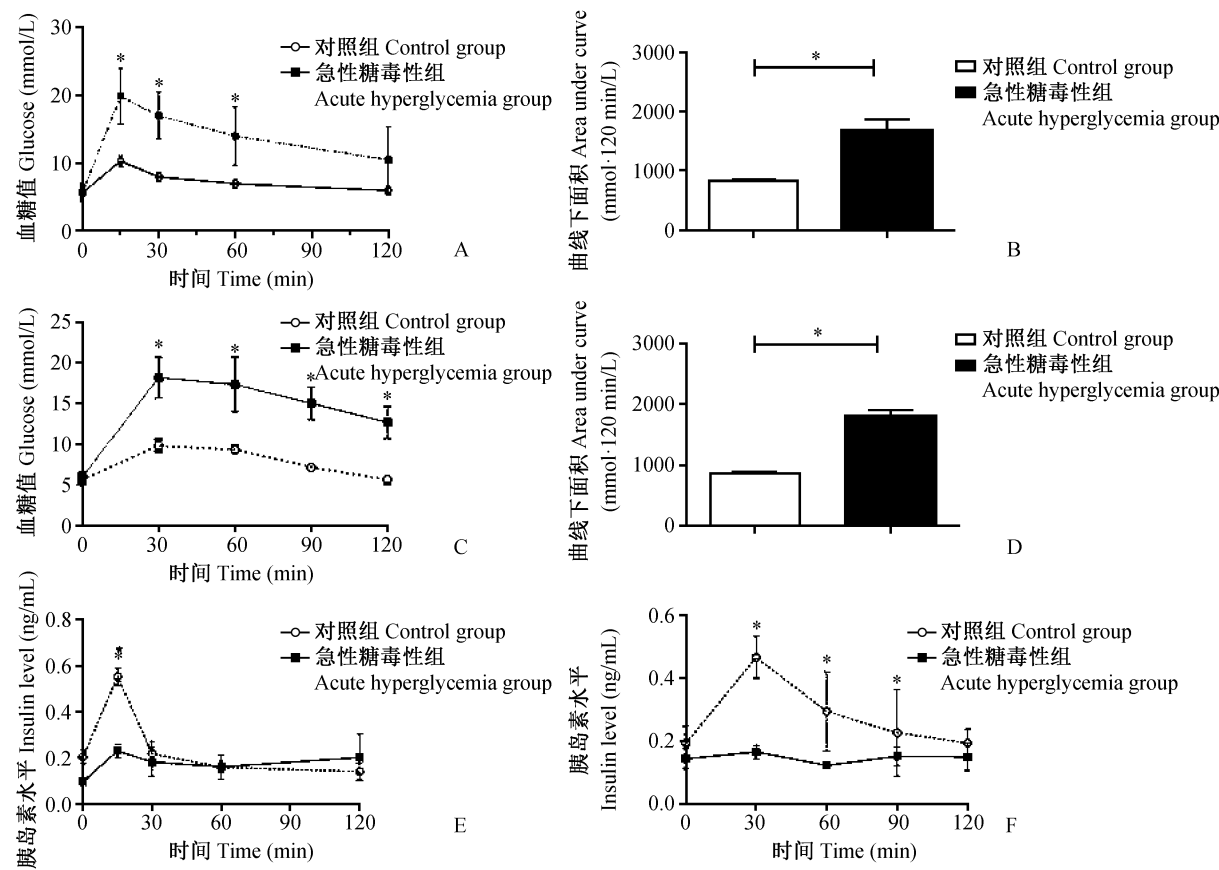
2.2 通过 IPGTT 及 OGTT 显示急性糖毒性对胰岛第一时相分泌的损伤特点

IPGTT 实验结果表明急性糖毒性组 15 min 血

糖值较对照组升高了 87% (*P* < 0.05),血糖值曲线下面积较对照组增加了 97% (*P* < 0.05);OGTT 实验中急性糖毒性组 30 min 血糖值较对照组升高了

85% ($P < 0.05$), 血糖值曲线下面积较对照组增加了 106% ($P < 0.05$), 表明体内葡萄糖代谢能力下降。见图 2A-D。而无论是 IPGTT 还是 OGTT, 血浆

胰岛素高峰都出现了延迟, 表明胰岛素早期分泌功能受损。见图 2E-F。



注:A、B 为 IPGTT 实验中对照组及急性糖毒性组血糖水平;C、D 为 OGTT 实验中对照组及急性糖毒性组血糖水平;E 为 IPGTT 实验中对照组及急性糖毒性组胰岛素水平;F 为 OGTT 实验中对照组及急性糖毒性组胰岛素水平。

图 2 对照组及急性糖毒性组的 IPGTT 及 OGTT 实验

Note. A, B, IPGTT: blood glucose levels in the control and acute hyperglycemia groups. C, D, OGTT: blood glucose levels in the control and acute hyperglycemia groups. E, IPGTT: insulin levels in the control and acute hyperglycemia groups. F, OGTT: insulin levels in the control and acute hyperglycemia groups.

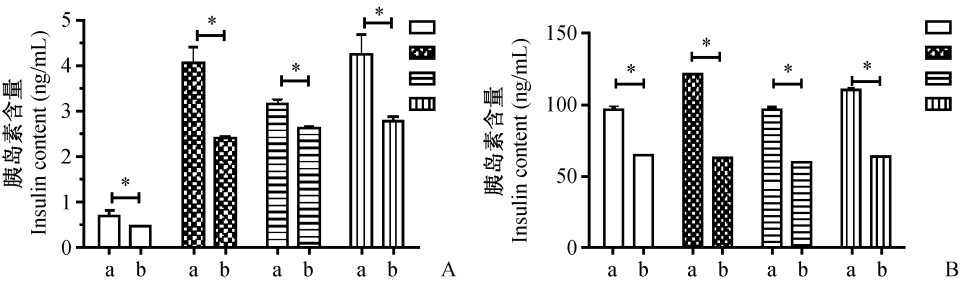
Fig. 2 Results of OGTT and IPGTT in the control and acute hyperglycemia groups

2.3 通过 GSIS 及胰岛素含量测定分析急性糖毒性对胰岛素储备影响

分离胰岛后,GSIS 实验中急性糖毒性组在基础状态(葡萄糖浓度 2.8 mmol/L)、高葡萄糖状态(16.7 mmol/L)、30 mmol/L 氯化钾及 40 mmol/L 氯化钾刺激后,胰岛素分泌水平较对照组分别降低了 46%、67%、20%、50% ($P < 0.05$)。胰岛素含量测定结果显示急性糖毒性组比对照组分别降低了 49%、95%、61%、74% ($P < 0.05$)。详见图 3。

2.4 通过 HE 染色及电镜观察急性糖毒性对胰岛细胞亚细胞结构的损伤

实验各组胰腺组织 HE 染色显示:对照组中胰岛外形规整,细胞质染色均匀;而急性糖毒性组中胰岛内部细胞排列不整齐且外部形态不规则,细胞质染色分布不均匀且颜色程度不一致,详见图 4A、B。胰岛组织电镜结果显示:对照组胰岛中 β 细胞胰岛素分泌颗粒成熟度高、空泡数量少;而急性糖毒性组中 β 细胞内成熟胰岛素分泌颗粒明显减少,空泡数量增加,线粒体数量增加,且存在线粒体肿胀及膜断裂等病理改变,详见图 4C-F。

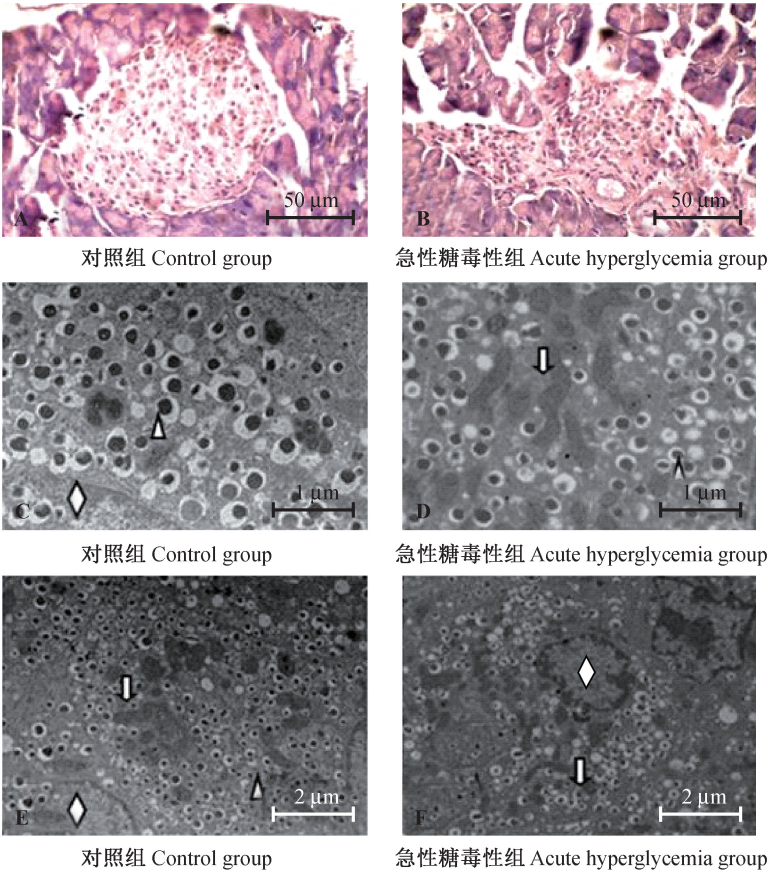


注:A 为葡萄糖及氯化钾刺激下对照组与急性糖毒性组的胰岛素分泌水平;B 为葡萄糖及氯化钾刺激下对照组与急性糖毒性组的胰岛素含量;其中 a 为对照组,b 为急性糖毒性组。

图 3 葡萄糖及氯化钾刺激下对照组及急性糖毒性组胰岛素水平

Note. A, insulin secretion was stimulated by glucose and potassium chloride in the control and acute hyperglycemia groups. B, insulin content of islets in the control and acute hyperglycemia groups. A, control group; b, acute hyperglycemia group.

Fig.3 The insulin levels stimulated by glucose and potassium chloride in the control and acute hyperglycemia groups



注:A、B 为对照组及急性糖毒性组胰腺组织 HE 染色图像(×400);C、E 为对照组胰岛组织透射电镜照片(×2000,×4000);D、F 为急性糖毒性组胰岛组织透射电镜照片(×2000,×4000);其中可见细胞核(◇)及线粒体(↓),胰岛素颗粒(Δ)。

图 4 对照组与急性糖毒性组的 HE 染色及透射电镜结果

Note. A, a pancreatic islet in a control mouse; B, a pancreatic islet in an acute hyperglycemic mouse; C, E, electron micrographs of islet cells in a control mouse; D, F, electron micrographs of islet cells in an acute hyperglycemic mouse. Nucleus (◇), mitochondria (↓) and insulin particles (Δ).

Fig.4 Histology and ultrastructure of pancreatic islets in the mice of control and acute hyperglycemia groups

3 讨论

本研究中 IPGTT 结果显示急性糖毒性组 15 min 血清胰岛素水平明显低于对照组,与之相对应的血糖值却显著高于对照组,因此急性糖毒性能够损害胰岛素第一时相分泌,而胰岛素第一时相分泌与糖尿病的发病密切相关,因此这可能成为糖尿病发病的新的诱因,这与之之前 Elena Toschi 在临床报道相一致^[4]。为观察胰岛 β 细胞受损与不同血糖浓度和刺激时间的关系,我们绘制葡萄糖浓度-时间和胰岛素浓度-时间曲线,并计算曲线下的面积。发现急性糖毒性组血糖曲线下的面积高于对照组,而胰岛素水平曲线下面积却低于对照组。Leahy^[5]表明糖毒性与血液葡萄糖浓度和输液时间相关,通过对大鼠连续葡萄糖输液 (2 mL/h) 48 h,成功地建立葡萄糖钳夹模型,这项研究验证了 48 h 持续高血糖可以减损胰岛素分泌功能,出现糖耐量减低表现。

既往研究没有确切的时间定义急性和慢性糖毒性。Leahy^[5]的研究最早定义 48 h 为慢性糖毒性。Evans-Molina^[9]定义 1 h 为急性葡萄糖刺激。本课题组前期研究中,定义 4 h 作为急性糖毒性,并发现急性糖毒性损伤确实会减损早期胰岛素分泌并减少小鼠胰岛 β 细胞中胰岛素含量。本研究证实了急性糖毒性损伤对胰岛素第一时相分泌的减损作用,但这种减损作用是由于胰岛素储备减低还是胰岛素敏感性下降造成的仍存在争议。本研究结果表明胰岛素分泌减少和胰岛素含量下降有关。既往体外研究^[10]表明,用 11 mmol/L 和 28 mmol/L 葡萄糖培养的胰岛细胞 7 d,胰岛素含量分别减少了 45% 和 60%,胰岛素分泌显著减少。

本研究 GSIS 实验结果发现,对照组及急性糖毒性组中分离、纯化后的胰岛在葡萄糖刺激下可分泌胰岛素,且本组分离所得胰岛在高葡萄糖刺激下分泌胰岛素量是基础葡萄糖的 4 倍以上,优于多数文献报道^[11-13]。而急性糖毒性组在葡萄糖浓度为 2.8 或 16.7 mmol/L 刺激分泌胰岛素水平比对照组分别下降了 46% 和 67% ($P < 0.05$),这与之之前报道的体外胰岛在葡萄糖浓度为 20 mmol/L 的培养基中培养 30 min 后,胰岛素分泌较对照组减少 75% 是类似的^[14]。既往研究中,Festa^[15]发现糖耐量受损和 2 型糖尿病患者的胰岛素分泌水平分别降低了 31% 和 70%。本研究中,急性糖毒性可以导致胰岛素分

泌减损,类似于 Festa 研究中的糖耐量受损组。慢性糖毒性研究发现,10 mmol/L 的高葡萄糖损伤就会引起胰岛素分泌降低^[16,17]。Ling^[18]发现后在 20 mmol/L 的高葡萄糖损伤就会引起胰岛素分泌降低。临床研究中^[19],体外环境下 25 mmol/L 高葡萄糖损伤 48 h 可使胰岛细胞的胰岛素 mRNA 含量减少,但在 30 min 内胰岛素分泌不会减少,故胰岛素分泌的减损是时间依赖性。

本研究发现急性糖毒性组胰岛出现边缘不规则的细胞核及较少的胰岛素分泌泡和大量的空泡,线粒体数量增加,但线粒体嵴有断裂。既往研究^[20]也发现慢性糖毒性可以减少胰岛素分泌泡并导致线粒体肿胀。本研究中发现急性糖毒性组胰岛素分泌泡数量减少,这说明确实存在胰岛素含量的减少及胰岛素分泌下降。此外,Morini^[21]发现糖毒性可诱导细胞膜骨架断裂和胰岛细胞线粒体肿胀,这也与胰岛素分泌功能障碍相关。

本研究使用戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉,对血糖没有影响,既往基础研究表明戊巴比妥钠麻醉大鼠对其血糖及胰岛素分泌没有影响,而芬太尼麻醉大鼠,会使其血糖升高^[22]。本研究已经发现急性糖毒性对胰岛素分泌的损伤作用,但其损伤机制的分子生物学研究,尚需进一步实验探讨。此外,急性糖毒性对胰岛造成的这种损伤是短暂一过性还是永久性目前尚不清楚,期待在未来的研究中进一步完善。

参 考 文 献

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years [J]. Cell, 2012, 148(6): 1160-1171.
- [3] Yan D, Zhao Y, Gao X, et al. Acute intravenous glucose load impairs early insulin secretion and insulin content in islet β cells in mice [J]. Life Sci, 2016, 144: 148-155.
- [4] Toschi E, Camastra S, Sironi AM, et al. Effect of acute hyperglycemia on insulin secretion in humans [J]. Diabetes, 2002, 51(Suppl 1): S130-S133.
- [5] Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, et al. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions [J]. J Clin Invest, 1986, 77(3): 908-915.
- [6] 周迎生,高妍,李斌,等.高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J].中国实验动物学报,2005,13(3):154-158.
- [7] Zhou YS, Gao Y, Guo XH, et al. Effects of timely insulin treatment on protection of beta cells in a rat model of type 2 diabetes mellitus [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(10): 1523-

- 1529.
- [8] Gao X, Yan D, Zhao Y, et al. Moderate calorie restriction to achieve normal weight reverses β -cell dysfunction in diet-induced obese mice: involvement of autophagy [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2015, 12: 34.
- [9] Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, et al. Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets [J]. *Diabetes*, 2007, 56(3): 827–835.
- [10] Meyer J, Sturis J, Katschinski M, et al. Acute hyperglycemia alters the ability of the normal β -cell to sense and respond to glucose [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(4): E917–E922.
- [11] Liu Z, Jeppesen PB, Gregersen S, et al. Chronic exposure to leucine in vitro induces β -cell dysfunction in INS-1E cells and mouse islets [J]. *J Endocrinol*, 2012, 215(1): 79–88.
- [12] da Silva Xavier G, Loder MK, McDonald A, et al. TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet β -cells [J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 894–905.
- [13] Boden G, Ruiz J, Kim CJ, et al. Effects of prolonged glucose infusion on insulin secretion, clearance, and action in normal subjects [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(2 Pt 1): E251–258.
- [14] Moran A, Zhang HJ, Olson LK, et al. Differentiation of glucose toxicity from β cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15 [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(3): 534–539.
- [15] Festa A, Haffner SM, Wagenknecht LE, et al. Longitudinal decline of β -cell function: comparison of a direct method vs a fasting surrogate measure: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(10): 4152–4159.
- [16] Laskewitz AJ, van Dijk TH, Grefhorst A, et al. Chronic prednisolone treatment aggravates hyperglycemia in mice fed a high-fat diet but does not worsen dietary fat-induced insulin resistance [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(8): 3713–3723.
- [17] Purrello F, Rabuazzo AM, Anello M, et al. Effects of prolonged glucose stimulation on pancreatic β cells: from increased sensitivity to desensitization [J]. *Acta Diabetol*, 1996, 33(4): 253–256.
- [18] Ling Z, Pipeleers DG. Prolonged exposure of human β cells to elevated glucose levels results in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(12): 2805–2812.
- [19] Thibault C, Guettet C, Laury MC, et al. In vivo and in vitro increased pancreatic β -cell sensitivity to glucose in normal rats submitted to a 48-h hyperglycemic period [J]. *Diabetologia*, 1993, 36(7): 589–595.
- [20] Jung HS, Chung KW, Won KJ, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(4): 318–324.
- [21] Morini S, Braun M, Onori P, et al. Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study [J]. *J anatomy*, 2006, 209(3): 381–392.
- [22] Johansen O, Vaaler S, Jorde R, et al. Increased plasma glucose levels after Hypnorm anaesthesia, but not after Pentobarbital anaesthesia in rats [J]. *Lab Anim*, 1994, 28(3): 244–248.

[收稿日期] 2017-05-04