

网络出版时间: 2020-12-9 16:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20201208.0842.002.html>

二甲双胍对 2 型糖尿病模型大鼠肾组织巨噬细胞移动抑制因子及其受体 CD74 表达的影响

刘佳瑞¹, 叶山东¹, 毕双杰², 周婉¹

摘要 目的 观察二甲双胍(MET)对 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠肾组织巨噬细胞移动抑制因子(MIF)及其受体 CD74、肾小球足细胞表面标志蛋白 podocalyxin(PCX)表达及尿蛋白排泄的影响,探讨 MET 对糖尿病肾病的可能保护机制。方法 44 只雄性 SD 大鼠随机选择 10 只作为正常对照组(NC 组),余下大鼠采用高脂饮食+小剂量链脲佐菌素 30 mg/kg 腹腔注射诱导 T2DM 大鼠模型。30 只 T2DM 模型大鼠随机分为 3 组,分别给予 MET(MET 组)、格列本脲(GLY 组)、0.9% 氯化钠溶液(DM 组)灌胃。灌胃 8 周后观察各组大鼠血液中血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、尿素氮(BUN)、尿液中白蛋白/肌酐(UACR)、MIF/肌酐(UMCR)、CD74/肌酐(UCCR)、PCX/肌酐(UPCR)以及肾组织 MIF、CD74、PCX mRNA 及蛋白表达的变化。结果 8 周末时,获得相应检测值:①与 DM 组比较,MET 组及 GLY 组 FBG、HbA1c、BUN、UACR、UMCR、UCCR、UPCR、肾组织 MIF、CD74 的 mRNA 和蛋白表达降低,但高于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);肾组织 PCX 表达升高,但低于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②与 GLY 组比较,MET 组 UACR、UMCR、UCCR 和 UPCR、肾组织 MIF、CD74 mRNA 和蛋白表达降低,PCX 表达升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$);两

组间 FBG 和 HbA1c 水平差异无统计学意义。结论 MET 对大鼠肾脏具有保护作用,该作用可能与其抑制 MIF-CD74 轴介导的炎症级联反应有关。

关键词 2 型糖尿病;二甲双胍;MIF;CD74;足细胞;格列本脲

中图分类号 R 587.24; R 977.15; R 977.15

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0006-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.002

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病最常见的慢性微血管并发症,炎症、氧化应激及足细胞受损均参与并促进其发生发展^[1-2]。足细胞特异性相关蛋白如足糖萼蛋白(podocalyxin,PCX)以及尿蛋白排泄增加有助于糖尿病肾脏损害的早期发现和诊断^[3]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitor factor,MIF)可在 CD74 刺激下迅速分泌,并通过刺激足细胞 CD74 受体促进炎症反应^[4-6]。二甲双胍(metformin,MET)作为各大糖尿病指南广泛推荐的降糖药物,对糖尿病肾脏可提供保护作用,其确切机制尚不明确。既往研究^[7]表明,MET 可通过抑制 MIF-CD74 轴介导的炎症级联反应在 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)患者中发挥足细胞保护作用。该研究将从动物角度进一步观察 MET 对 T2DM 大鼠肾组织 MIF、CD74、PCX 表达及尿 PCX 排泄水平的影响,旨在初步探讨 MET 对 T2DM 大鼠肾脏的保护作用

2020-09-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81800713);安徽省中央引导地方科技发展专项(编号:2017070802D147)

作者单位:¹安徽医科大学附属医院内分泌科,合肥 230001

²中国科技大学附属第一医院内分泌科,合肥 230001

作者简介:刘佳瑞,女,硕士研究生;

叶山东,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: ysd196406@163.com

number of cytotoxic hydroxyl radicals produced by the copper silicate nanoparticles in cancer cells was evaluated by cell experiments, and the therapeutic effect of the nanoparticles on cancer cells was further evaluated. **Results** TEM images showed that mesoporous silica and copper silicate nanoparticles showed spherical morphology with good monodispersity. The average hydration particle sizes were 85.9 nm and 204.4 nm, respectively. The results of nitrogen adsorption-desorption curve showed that the specific surface area of mesoporous silica and copper silicate nanoparticles were 26.8 m²/g and 5.36 m²/g, respectively, and the pore size of the nanoparticles was 18.9 nm and 1.66 nm, respectively. Subsequently, through cell experiments, we knew that mesoporous silica nanoparticles had excellent biocompatibility, while copper silicate nanoparticles showed a strong inhibition on cancer cells.

Conclusion In this study, copper silicate nanoparticles were successfully prepared and achieved good antitumor performance, indicating that they have a good prospect of chemokinetic therapy.

Key words chemodynamic therapy; copper silicate nanoparticles; hydroxyl radicals

及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF级2月龄雄性(♂)SD大鼠44只,体质量(200 ± 20)g,由安徽医科大学动物中心提供。实验期间,12 h光照-12 h黑暗交替照明,室温(19 ± 1)℃,自由进食。链脲佐菌素购自美国Sigma公司;MET购自上海施贵宝制药公司;格列本脲购自天津太平洋制药公司;PCR试剂盒及引物、TRIzol试剂购于大连TaKaRa公司;Western blot试剂购自北京化学试剂公司;白蛋白放射免疫试剂盒购于天津市协和公司;肌酐、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒购自南京建成科技公司;尿MIF、CD74和PCX ELISA试剂盒购自武汉基因美科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型大鼠制备 大鼠随机分为对照组(NC组 $n=10$,常规正常喂养)和高脂喂养组($n=34$,普通饲料+10%猪油+2%胆固醇)。喂养4周后,高脂喂养组予链脲佐菌素30 mg/kg(溶解于现配制的0.1 mmol/L枸橼酸缓冲液中, pH=4.4)腹腔一次性注射,NC组予以等量枸橼酸缓冲液腹腔注射。链脲佐菌素腹腔注射72 h后,尾静脉采血测大鼠空腹血糖(采血前各组大鼠禁食8 h,正常饮水),测得血糖 ≥ 16.7 mmol/L即造模成功,共30只。成模大鼠随机分为3组,分别给予MET[MET组 $n=10$,300 mg/(kg·d)],格列本脲[GLY组 $n=10$,5 mg/(kg·d)],0.9%氯化钠溶液(DM组 $n=10$),每日上午9:00—10:00灌胃给药,且连续高脂饮食喂养。干预8周后,代谢笼收集12 h随机尿液前所有实验大鼠禁食24 h,置该尿液于-40℃冰箱,待测尿白蛋白、尿MIF、CD74、PCX和尿肌酐(urine creatinine, Ucr);腹主动脉插管留取血标本(10%水合氯醛腹腔注射麻醉)待测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)及BUN;肾组织取出后,去肾表面包膜同时0.9%氯化钠溶液反复冲洗,将右肾部分组织于液氮中保存,用于荧光定量PCR及Western blot检测,余下肾组织用以观察各组肾脏病理改变。

1.2.2 生化指标检测 HPLC系统测定HbA1c,尿酸酶法测定血BUN,苦味酸比色法测定Ucr,放射免疫分析法测定UAib,ELISA法检测尿MIF、CD74和PCX。分别计算尿白蛋白、MIF、CD74、PCX与Ucr比值[分别表示为尿白蛋白/肌酐(urinary albumin/

Ucr, UACR)、尿MIF/肌酐(urinary MIF/Ucr, UM-CR)、尿CD74/肌酐(urinary CD74/Ucr, UCCR)和尿PCX/肌酐(urinary PCX/Ucr, UPCR)]。

1.2.3 肾小球透射电镜检测 2.5%戊二醛固定1 mm³肾皮质小块,制成60~80 μm超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色并清洗后于10 000×电镜下观察,随机测量5处肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)厚度并取其平均值作为基底膜平均厚度(glomerular basement membrane thickness, GBMT),GBM上融合足突的总长度/GBM的总长度为足突融合率(RFFP),同时观察GBM及足细胞形态学改变。

1.2.4 荧光定量PCR检测肾组织MIF、CD74、PCX mRNA表达水平 TRIzol法提取肾组织RNA,2 μg总RNA逆转录为cDNA,SYBY Green试剂对产物进行荧光定量PCR。使用ABI 7500型扩增仪,荧光染料法进行目的基因扩增(总反应体系20 μl)。对目的基因及内参(β -actin)进行扩增时,均设置3个复孔(注意避免体系贴壁或产生气泡,加样完成后立即扩增),运用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析 C_t 值, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因mRNA表达拷贝数与 β -actin拷贝数的比值。见表1。

表1 引物序列

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
MIF	ACTTGGGTCACACCGCACTTA	AGCTCGGAGAGAAACCCCTC
CD74	AGATCGGGATGGCTACTCC	TCATGTTGCCGTACTTGGAAC
PCX	GCAGGGCTTTGAACCTCTTG	GCTCTGTGACACTCGGATTT
β -actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC	CCCATACCCACCATCACACC

1.2.5 Western blot检测肾组织MIF、CD74、PCX蛋白表达 RIPA法提取肾组织总蛋白,取50 μg蛋白通过SDS-PAGE电泳分离并转移至PVDF膜,封闭,一抗MIF(1:1 000)、CD74(1:300)、PCX(1:1 000)于4℃孵育过夜,洗膜,二抗(1:10 000)持续孵育1 h,随之进行化学发光反应,化学发光图像分析系统定量分析免疫印迹结果。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性数据采用单因素方差分析进行多组间比较,两组间比较采用SNK- q 检验;不符合正态分布或方差不齐者比较采用Dunnett's T 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组生化指标比较 8周末,与NC组比较,其

他各组 FBG、HbA1c、BUN、UACR、UMCR、UCCR 和 UPCR 水平均升高 ($P < 0.05$); 与 DM 组相比, MET 组和 GLY 组上述指标下降 ($P < 0.05$); 与 GLY 组比较, MET 组 BUN、UACR、UMCR、UCCR、UPCR 降低 ($P < 0.05$), 两组间 FBG 和 HbA1c 差异无统计学意义。见表 2。

2.2 肾小球病理改变 NC 组 GBM 薄厚均匀, 结构清晰, 且足细胞形态正常且结构完整、足突基本未发生融合并呈整齐排列; DM 组 GBM 呈弥漫增厚, 结构模糊不清, 足突增宽融合、脱离甚至消失; MET 组、GLY 组肾 GBMT 和足突融合程度较 DM 组均有改善, 且两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 NC 组相比, DM 组 GBMT 升高 ($P < 0.05$), 足突融合率 (foot process fusion rate, FRFP) $> 80\%$; 与 DM 组比较, MET 组和 GLY 组 GBMT 降低, 且 MET 组低

于 GLY 组 ($P < 0.05$), MET 组 FRFP $< 50\%$, GLY 组 FRFP 约 60% 。见图 1、表 3。

2.3 各组大鼠肾组织 MIF、CD74、PCX mRNA 表达的比较 与 NC 组比较, 其他各组 MIF、CD74 mRNA 表达水平均升高, PCX mRNA 表达水平降低; MET 组和 GLY 组 MIF、CD74 mRNA 表达水平低于 DM 组, PCX mRNA 表达水平升高, 且 MET 组低于 GLY 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组大鼠 MIF、CD74、PCX 蛋白表达的比较

Western blot 结果显示: 与 NC 组比较, 其他各组 MIF、CD74 蛋白相对表达量均升高, PCX 蛋白相对表达量降低; MET 组和 GLY 组 MIF、CD74 蛋白相对表达量低于 DM 组, PCX 蛋白相对表达量升高, 且 MET 组优于 GLY 组 ($P < 0.05$)。见图 2。

表 2 各组生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

项目	NC 组	DM 组	MET 组	GLY 组	F 值
FBG (mmol/L)	4.45 $\pm$ 1.07	15.60 $\pm$ 1.56*	11.75 $\pm$ 0.98* #	11.78 $\pm$ 1.42* #	89.78
HbA1c (%)	4.13 $\pm$ 0.89	12.41 $\pm$ 0.61*	8.78 $\pm$ 0.32* #	8.85 $\pm$ 1.07* #	153.91
BUN (mmol/L)	6.91 $\pm$ 2.52	18.95 $\pm$ 0.98*	11.30 $\pm$ 2.02* # Δ	14.03 $\pm$ 2.55* #	24.55
UACR (mg/g)	34.09 $\pm$ 2.92	136.31 $\pm$ 6.84*	98.92 $\pm$ 5.40* # Δ	110.10 $\pm$ 6.76* #	278.70
UMCR (μ g/g)	4.98 $\pm$ 0.29	32.09 $\pm$ 2.42*	18.70 $\pm$ 1.89* # Δ	23.82 $\pm$ 4.43* #	23.16
UCCR (μ g/g)	2.04 $\pm$ 0.79	8.47 $\pm$ 0.10*	6.64 $\pm$ 1.38* # Δ	7.42 $\pm$ 1.82* #	21.28
UPCR (μ g/g)	0.79 $\pm$ 0.04	10.73 $\pm$ 0.29*	5.63 $\pm$ 0.82* # Δ	8.47 $\pm$ 0.40* #	29.87

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 T2DM 组比较: # $P < 0.05$; 与 GLY 组比较: $\Delta P < 0.05$

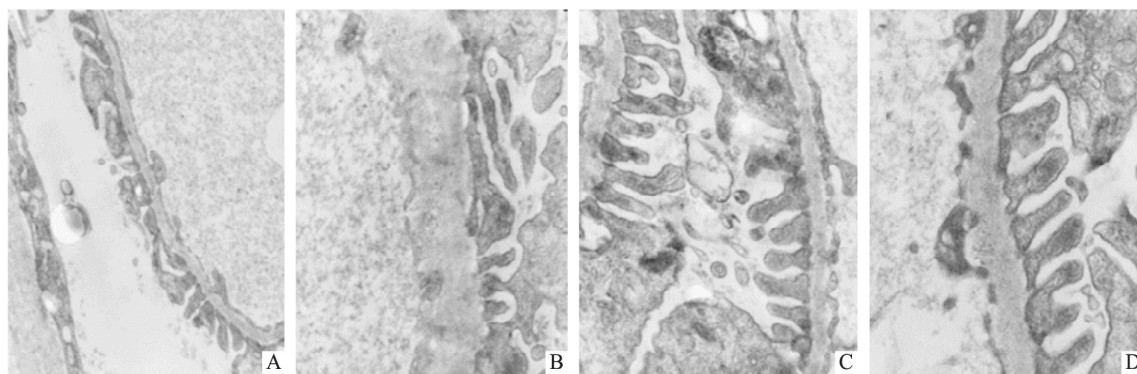


图 1 各组肾脏电镜下病理改变 $\times 10\ 000$

A: NC 组; B: DM 组; C: MET 组; D: GLY 组

表 3 各组 GBMT、MIF、CD74 及 PCX mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	GBMT (nm)	FRFP (%)	MIF mRNA	CD74 mRNA	PCX mRNA
NC	106.00 $\pm$ 10.23	0.04 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.04	1.32 $\pm$ 0.12	7.62 $\pm$ 0.21
DM	266.58 $\pm$ 21.68*	0.80 $\pm$ 0.08*	7.58 $\pm$ 0.20*	4.36 $\pm$ 0.70*	1.04 $\pm$ 0.04*
MET	150.98 $\pm$ 17.25* # Δ	0.49 $\pm$ 0.04* # Δ	2.77 $\pm$ 0.08* # Δ	2.80 $\pm$ 0.03* # Δ	4.80 $\pm$ 0.72* # Δ
GLY	203.67 $\pm$ 23.32* #	0.57 $\pm$ 0.03* #	4.06 $\pm$ 0.18* #	3.20 $\pm$ 0.14* #	2.16 $\pm$ 0.13* #
F 值	76.41	121.61	403.93	89.21	20.81

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 DM 组比较: # $P < 0.05$; 与 GLY 组比较: $\Delta P < 0.05$

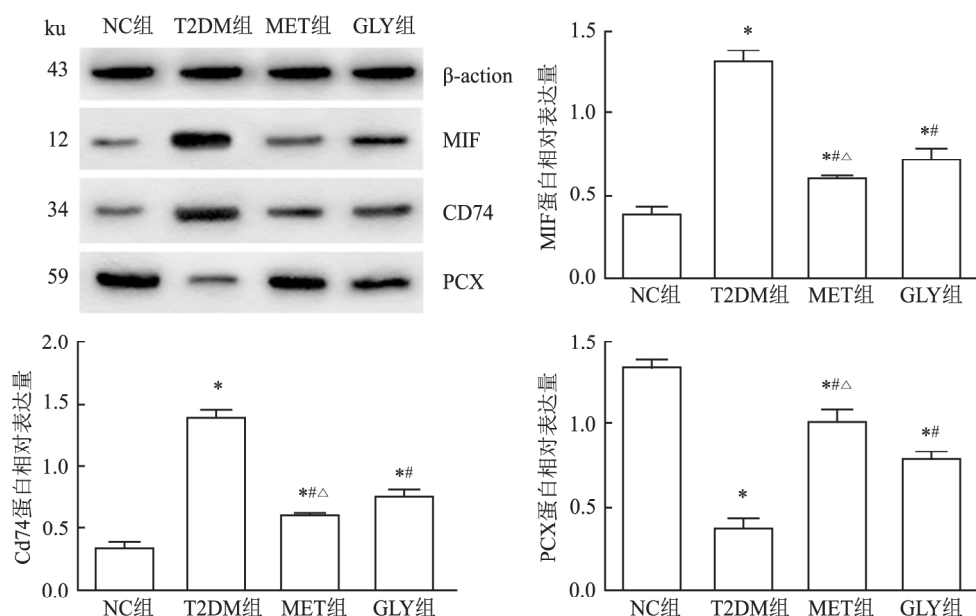


图2 各组肾组织 MIF、CD74 及 PCX 蛋白表达

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 T2DM 组比较: # $P < 0.05$; 与 GLY 组比较: △ $P < 0.05$

3 讨论

尿白蛋白和肾小球足细胞标志蛋白排泄增加是糖尿病肾脏损害的早期敏感标志。糖尿病肾病早期阶段,许多生物标志物能够反映肾脏在肾单位特定部位的损伤,如尿 PCX 可反映足细胞受损程度^[8-9]且与糖尿病患者 UACR 呈正相关^[10]。MIF 是广泛表达的多效细胞因子,它可通过刺激 CD74 受体及其他机制在肾小球足细胞中促进炎症反应^[6]。有研究^[11]表明糖尿病患者尿 MIF 和 CD74 排泄水平高于正常对照组,且与糖尿病足细胞损伤程度呈正相关。转录组学分析还显示,高血压肾病中组织肾 CD74 mRNA 增加。

MET 作为治疗 T2DM 患者的使用最广泛的降糖药物,近年来不少研究^[12-13]显示 MET 尚可通过调节脂质代谢,激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),减轻线粒体、内质网应激以及减少糖基化终末产物等发挥降糖之外的肾脏保护作用。有研究^[13]报道 MET 可通过减少糖尿病大鼠 PCX 表达改善足细胞损伤,表明 MET 对糖尿病诱导的足细胞的损伤有保护作用。本研究显示, MET 及格列本脲药物干预 8 周后,尿白蛋白、GBMT、FRFP、足细胞病理形态学损伤较 T2DM 组均有所改善,且 MET 组优于 GLY 组,但 MET 组和 GLY 组两组间 FBG 和 HbA1c 值无统计学差异,提示 MET 可发挥独立于降糖作用的肾脏(包括肾小球足细胞)保护作用。进一步观察显示,

T2DM 组大鼠肾组织 MIF、CD74 mRNA 和蛋白表达升高,PCX 表达降低,经 MET、格列本脲干预后,模型大鼠肾组织 MIF、CD74 蛋白和 mRNA 表达均降低,PCX 表达升高,且尿白蛋白及 PCX 排泄减少,且在血糖控制差异基本无差异时, MET 组优于格列本脲,提示 MET 在相似降糖条件下能更有效地抑制 T2DM 大鼠肾组织 MIF、CD74 的上调及 PCX 的下调,该作用可能是 MET 保护肾脏损害的重要途径之一。目前的临床和实验性研究^[6]证实, MIF 可激活局部肾小球足细胞表面 CD74,导致细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 和 p38MAPK 的磷酸化。MET 可以缓解高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞氧化应激和磷酸化的 P38 丝裂原活化蛋白酶(p-p38MAPK)蛋白表达^[14]。结合之前的研究^[7],推测 MET 干预后大鼠肾组织 MIF、CD74 的表达及尿 MIF、CD74 排泄的减少,可能通过抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 途径的磷酸化,从而下调炎症相关细胞因子的表达(如 TNF-α、MCP-1),进而对足细胞提供保护。

参考文献

- [1] Cui S, Zhu Y, Du J, et al. CXCL8 antagonist improves diabetic nephropathy in male mice with diabetes and attenuates high glucose-induced mesangial injury[J]. Endocrinology 2017, 158(6): 1671-84.
- [2] Li S, Liu X, Lei J, et al. Crocin protects podocytes against oxidative stress and inflammation induced by high glucose through inhibition of NF-κB[J]. Cell Physiol Biochem 2017, 42(4): 1481-

- 92.
- [3] Ye H , Bai X , Gao H , et al. Urinary podocalyxin positive-element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Complications* 2014 28(1): 96–100.
- [4] Djurdjaj S , Lue H , Rong S , et al. Macrophage migration inhibitory factor mediates proliferative GN *via* CD74 [J]. *J Am Soc Nephrol* , 2016 27(6): 1650–64.
- [5] Chen S J , Liao D L , Shen T W , et al. Genetic signatures of heroin addiction [J]. *Medicine (Baltimore)* 2016 95(31): e4473.
- [6] Chen C , Chang J , Yang Y , et al. Macrophage migration inhibitory factor regulates integrin $\beta 1$ and cyclin D1 expression *via* ERK pathway in podocytes [J]. *Biomed & Pharmacother* , 2020 , 124: 109892.
- [7] Xing Y , Ye S , Chen Y , et al. MIF/CD74 axis is a target for metformin therapy in diabetic podocytopathy –real world evidence [J]. *Endokrynol Pol* 2018 69(3): 264–8.
- [8] 吴凡, 陈韵颖, 肖花, 等. 尿液细胞外囊泡中的 podocalyxin 在糖尿病肾病诊断中的价值 [J]. *南方医科大学学报* 2018 38(9): 1126–30.
- [9] Lin H , Ye S , Xu J , et al. The alpha-lipoic acid decreases urinary podocalyxin excretion in type 2 diabetics by inhibiting oxidative stress *in vivo* [J]. *J Diabetes Complications* 2015 29(1): 64–7.
- [10] 杨伏猛, 刘倩, 王彦, 等. 尿足细胞及其标志蛋白 podocalyxin 测定对 2 型糖尿病肾病的诊断价值 [J]. *临床检验杂志* , 2016 34(5): 378–81.
- [11] Rastaldi M P , Ruiz-Ortega M , Martin-Ventura J L , et al. The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury [J]. *J Am Soc Nephrol* 2009 20(2): 353–62.
- [12] 丁俊, 章秋, 李芳, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠肝脏 JNK 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2010 45(3): 334–7.
- [13] Zhai L , Gu J , Yang D , et al. Metformin ameliorates podocyte damage by restoring renal tissue podocalyxin expression in type 2 diabetic rats [J]. *J Diabetes Res* 2015 2015: 231825.
- [14] Yao X M , Ye S D , Xiao C C , et al. Metformin alleviates high glucose mediated oxidative stress in rat glomerular mesangial cells by modulation of p38 mitogen-activated protein kinase expression *in vitro* [J]. *Mol Med Rep* 2015 12(1): 520–6.

Effects of metformin on MIF/CD74 expression of renal tissues in type 2 diabetic rats

Liu Jiarui¹ , Ye Shandong¹ , Bi Shuangjie² , et al

(¹Dept of Endocrinology ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001;

²Dept of Endocrinology ,The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China ,Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effects of metformin (MET) on the MIF ,CD74 and podocalyxin(PCX) expression in renal tissues of type 2 diabetic mellitus (T2DM) rats ,and explore its possible renoprotective mechanisms. **Methods** 10 SD rats served as normal control group (NC , $n = 10$) ,30 type 2 diabetes SD rats induced by high fat diet and streptozotocin were randomly divided into DM group ,MET group and glibenclamide(GLY) group. 8 weeks later ,fasting blood glucose (FBG) ,hemoglobin A1c (HbA1c) ,blood urea nitrogen (BUN) ,urine albumin/creatinine (UACR) ,MIF/creatinine (UACR) ,CD74/creatinine (UCCR) ,PCX/creatinine (UPCR) , and MIF ,CD74 ,PCX mRNA and relative protein expression in renal tissue were measured. **Results** ① The FBG , HbA1c ,BUN ,UACR ,UMCR ,UCCR ,UPCR and the mRNA and protein expression of MIF and CD74 in renal tissue in MET group and GLY group were significantly lower than those in DM group ,but higher than those in NC group ($P < 0.05$) . The expression of PCX in renal tissue was significantly higher than that in DM group , which was lower than that in NC group ($P < 0.05$) . ② Compared with GLY group ,UACR ,UMCR ,UCCR ,UPCR and the expression of MIF and CD74 mRNA and protein in renal tissue in MET group decreased significantly , and the expression of PCX was significantly increased. There was no significant difference in FBG and HbA1c levels between two groups. **Conclusion** MET exerts a reno-protective effect of type 2 diabetic rats , which may be related to its inhibition of the MIF-CD74 axis-mediated inflammatory cascade.

Key words type 2 diabetes; metformin; macrophage migration inhibitory factor; CD74; podocyte; glibenclamide