文章编号:1000-5404(2009)15-1471-04

论著

磷脂酶 Cβ1 过表达对葡萄糖刺激胰岛素分泌的影响

周恒宇[1],邓华聪[1],郑宏庭[2],蒋 文[3],南 静[1],陈丹燕[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;[2]第三军医大学新桥医院内分泌科,重庆 400037;[3]重庆市中医院急诊科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察过表达磷脂酶 Cβ1(phospholipase C β1,PLCβ1)对葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)的影响。**方法** ①设定葡萄糖浓度梯度:10、20、40、80、100 mmol/L,分别刺激 INS-1 细胞 40 min,检测细胞培养上清液中胰岛素含量,确定最适的葡萄糖刺激浓度;设定时间梯度:20、40、60、80、120 min,以最适葡萄糖浓度刺激,检测胰岛素含量,确定最适的刺激时间。②以最适葡萄糖浓度刺激 INS-1 细胞适当时间后,RT-PCR 检测 PLCβ1 表达变化。③构建 PLCβ1 真核表达载体(PCMV-HA-PLCβ1),转染 INS-1 细胞,Western blot 检测 INS-1 细胞中 PLCβ1 蛋白的表达。④收集转染后 INS-1 细胞培养上清液,检测胰岛素含量。**结果** 用 40 mmol/L 葡萄糖刺激 60 min,INS-1 细胞的胰岛素分泌量最大;RT-PCR 观察刺激后 PLCβ1 表达显著升高;过表达 PLCβ1 的 INS-1 细胞培养上清液中胰岛素含量为(1.906±0.080) ng/ml,较转染 PCMV-HA 载体的对照组(0.740±0.091) ng/ml 显著升高($P<0.01$)。**结论** 过表达 PLCβ1 显著增加 INS-1 细胞的胰岛素分泌,提示 PLCβ1 可能参与 GSIS 信息传递。

关键词: 磷脂酶 Cβ1;葡萄糖刺激胰岛素分泌;过表达;胰岛素;瞬时转染
中图法分类号: R335.6; R345; R394.1 **文献标识码:** A

Overexpression of phospholipase cβ1 improves glucose-stimulated insulin secretion in INS cells

ZHOU Heng-yu[1], DENG Hua-cong[1], ZHENG Hong-ting[2], JIANG Wen[3], NAN Jing[1], CHEN Dan-yan[1] ([1]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400037; [3]Department of Emergency, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the role of phospholipase Cβ1 (PLCβ1) in the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). **Methods** ①Glucose at the concentrations of 10, 20, 40, 80 mol/L and 100 mmol/L was used to treat INS-1 cells respectively for 40 min. The content of insulin in the INS-1 supernatant was detected for the optimal concentration of glucose. Then the decided concentration was used to the cells for 20, 40, 60, 80 and 120 min respectively for the optimal time to induce insulin secretion. ②RT-PCR was used to detect the expression of PLCβ1 at the optimal glucose concentration for the optimal time. ③Eukaryotic expression vector PCMV-HA-PLCβ1 was constrcted and then transiently transfected into INS-1 cells under the optimal concentration and treatment time. The PLCβ1 protein was detected by Western blot analysis. ④Rat insulin ELISA kit was used to detect the content of insulin in the INS-1 supernatant. **Results** Exposed to INS-1 cells to 40 mmol/L glucose for 60 min, the content of insulin secretion reached the maximum and RT-PCR indicated the expression of PLCβ1 was raised. Compared to the control [(0.740±0.091) ng/ml], the insulin's content in the supernatant of INS-1 cells with overexpressed PLCβ1 was raised [(1.906±0.080) ng/ml] ($P<0.01$). **Conclusion** Transient overexpression of PLCβ1 in INS-1 cells improves the insulin secretion, so PLCβ1 probably participates in the signal transduction pathway of GSIS in INS-1 cells.

Key words: phospholipase C β1; glucose-stimulated insulin secretion; overexpression; insulin; transient transfection

基金项目: 国家自然科学基金(30700384);重庆市自然科学基金(2006BB5098)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700384) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5098)
作者简介: 周恒宇,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事胰岛素分泌机制方面的研究。E-mail: zhoubianbian123@163.com
通信作者: 邓华聪,E-mail: deng_huacong@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-11-19;**修回日期:** 2008-12-16

磷脂酶 C(phospholipase C,PLC)是磷脂酰肌醇信号通路的关键酶,在体内分布极为广泛。许多细胞外信息分子,如激素、神经递质、细胞因子、生长因子等都可以激活 PLC,进而调控细胞代谢。Zawalich 等[1]研究结果显示葡萄糖刺激胰岛 β 细胞后,细胞内三磷酸肌醇(IP_3)、二酰基甘油(DAG)表达增加,IP_3 和 DAG 同为 PLC 活化产物,提示 PLC 可能参与葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)。随后 Thore 等[2]用 PLC 特异性抑制剂 U73122 抑制其活性,发现葡萄糖刺激的胰岛素分泌明显降低,证明 PLC 参与 GSIS 信息传递。

目前在哺乳动物中已鉴定出 15 种 PLC 亚型,随着对 PLC 分类的细化,何种 PLC 亚型参与 GSIS 成为亟待解决的问题。Akgoz 等[3]研究发现在大鼠的胰岛中有 PLCβ1 表达。近期 Kim 等[4]发现正常大鼠胰岛 β 细胞中 PLCβ1 大量表达,用高脂高糖饮食饲养大鼠诱发糖尿病后,PLCβ1 表达量降低,提示 PLCβ1 有可能参与胰岛 β 细胞的胰岛素分泌调节反应。为明确 PLCβ1 是否参与 GSIS 信息传递,本课题组培养大鼠胰岛素瘤细胞株 INS-1 细胞,构建 PLCβ1 真核表达载体(PCMV-HA-PLCβ1),瞬时转染到 INS-1 细胞中,观察细胞培养上清液中胰岛素含量的变化。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

INS-1 细胞购自中国典型培养物保藏中心,大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,PCMV-HA 载体、大肠杆菌 *E. coli* 为我室保存,限制性内切酶、DNA 连接酶均为 TaKaRa 产品,抗鼠 PLCβ1 多克隆抗体及其他抗体为 BD 公司产品,RPMI1640 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司,Chemiluminescent Substrate 试剂盒购自 PIERCE 公司。

1.2 INS-1 细胞培养

INS-1 细胞培养于 RPMI1640 培养液中,加入 10 % 胎牛血清、11.1 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、50 μmol/L β 巯基乙醇、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素,置于 5% CO_2 的 37 ℃孵箱中培养,每 3 天换液 1 次,每周按1∶3传代。

1.3 绘制 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线

设定葡萄糖浓度梯度:10、20、40、80、100 mmol/L,分别刺激 INS-1 细胞 40 min,收集细胞培养上清液,用大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒检测上清液中胰岛素含量,确定最适的葡萄糖刺激浓度;设定时间梯度:20、40、60、80、120 min,以最适葡萄糖浓度刺激,收集细胞培养上清液,检测上清液中胰岛素含量,确定最适的刺激时间。

1.4 半定量 RT-PCR

以最适葡萄糖浓度刺激 INS-1 细胞适当时间后,收集 INS-1 细胞,提取 RNA,反转录;以不含葡萄糖的 RPMI1640 培养液刺激 INS-1 细胞相同时间后收集 INS-1 细胞,提取 RNA,反转录,作为对照。合成 PLCβ1 基因的引物:正义链:5′-CCTCCCA-CAACACCTATCT-3′,反义链:5′-CAAAGGAGAGGATGACAGGG-3′,产物大小:249 bp。以 2 组反转录产物为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min,共 35 个循环。PCR 扩增产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 PLCβ1 真核表达载体的构建

1.5.1 获取 PLCβ1 全长 cDNA 序列 设计获取 PLCβ1 全长 cDNA 序列的引物:正义链含有 *Eco*R Ⅰ酶切位点 5′-AAGAAT-TCATGGCTGGGGCTCAG-3′,反义链含有 *Not* Ⅰ酶切位点 5′-AAGCGGCCGCTCACCACTTGAG-3′, 产物大小:3 712 bp。以提取的 INS-1 细胞 RNA 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 ℃ 40 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 4 min,共 35 个循环。PCR 扩增产物以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5.2 PLCβ1 基因克隆入 PCMV-HA 载体 分别用限制性内切酶(*Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶)双酶切 PCR 产物和 PCMV-HA 载体。酶切产物经胶回收试剂盒纯化后,将线性化的载体与 PLCβ1 基因按体积比 1∶3混合,用 T_4 DNA 连接酶连接,4 ℃过夜。一步法转化大肠杆菌 *E. coli*,随机挑选氨苄抗性菌落,扩增后提取质粒,酶切鉴定,将送予测序。

1.6 PCMV-HA-PLCβ1、PCMV-HA 重组质粒瞬时转染 INS-1 细胞

转染前接种 INS-1 细胞于 6 孔板中 2 孔,分别将 1 μl 重组质粒 PCMV-HA-PLCβ1、1 μl 质粒 PCMV-HA 与 10 μl Lipofectamine 2000 在 1 ml 无血清 RPMI1640 培养液中混合,室温放置 40 min。观察 6 孔板中的 INS-1 细胞融合度达 80% 左右时开始转染,PBS 漂洗细胞 1 次,将转染前配制 2 ml 无血清 RPMI1640 各取 1 ml 分别滴加于 2 孔中,5% CO_2、37 ℃恒温箱中培养 6 h 后每孔添加 1 ml 含有 20% 胎牛血清的 RPIM1640 培养液,培养 48 h。

1.7 PLCβ1 蛋白的 Western blot 分析

将瞬时转染 PCMV-HA-PLCβ1 和 PCMV-HA 的 INS-1 细胞接种于 24 孔板中 2 孔,60 μl 1 × SDS/孔裂解细胞,提取蛋白,10% SDS-PAGE 电泳,转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,5% 脱脂牛奶液封闭,分别用稀释 1 000 倍的兔抗鼠 PLCβ1 一抗和稀释 2 000 倍 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育,Chemiluminescent Substrate 试剂盒显色。

1.8 检测 INS-1 细胞培养上清液的胰岛素含量

将转染 PCMV-HA-PLCβ1 的 INS-1 细胞设为实验组,转染 PCMV-HA 载体的 INS-1 细胞设为对照组。分别用 40 mmol/L 葡萄糖刺激 2 组瞬时转染的 INS-1 细胞 60 min,收集培养上清液,用大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒检测胰岛素含量。

2 结果

2.1 INS-1 细胞生长情况

INS-1 细胞贴壁生长,形状不规则,由胞体向外伸出触角,

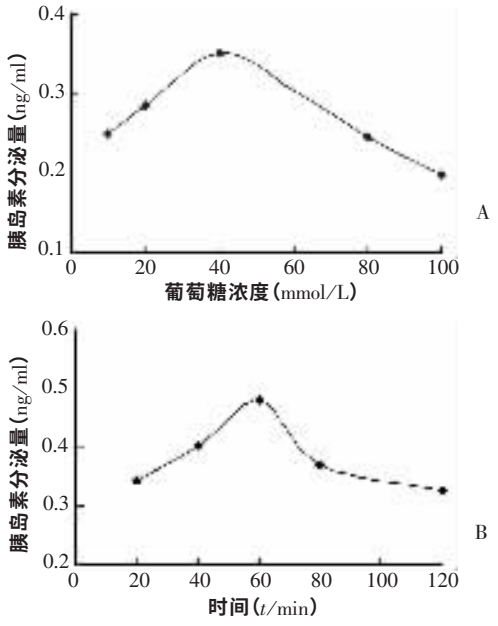
生长 2 ~ 3 d 后,细胞融合成细胞岛。

2.2　葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌

设定葡萄糖刺激的浓度梯度和时间梯度,刺激 INS-1 细胞,收集细胞培养上清液,检测胰岛素含量,描绘 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线(图 1)。结果显示:40 mmol/L 葡萄糖刺激 INS-1 细胞 60 min,胰岛素分泌量达最大。

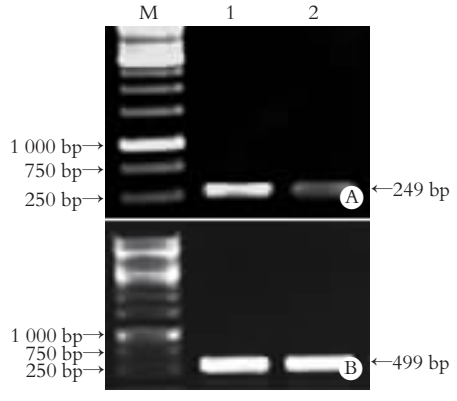
2.3　RT-PCR 检测 PLCβ1 表达变化

40 mmol/L 葡萄糖刺激 INS-1 细胞 60 min,提取 RNA、反转录,以转录产物为模板,用 RT-PCR 的方法观察 PLCβ1 表达变化(图 2)。结果显示葡萄糖刺激 INS-1 细胞后,PLCβ1 表达量明显升高。



A:不同浓度葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线;B:不同葡萄糖刺激时间 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线

图 1　葡萄糖刺激 INS-1 细胞胰岛素分泌曲线

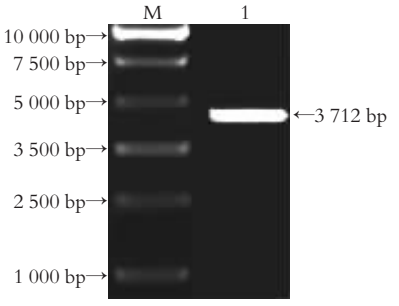


A: PLCβ1; B: GAPDH　　M:DNA 标准(DL 2000); 1:葡萄糖刺激 INS-1 细胞; 2:对照组

图 2　RT-PCR 检测 PLCβ1 在 INS-1 细胞中的表达

2.4　PLCβ1 基因的扩增和真核表达载体的构建

构建 PCMV-HA-PLCβ1 质粒,切下与预期大小(3 712 bp)相符的特异性条带(图 3),测序结果与 GenBank(NM001077641)一致,载体构建成功。

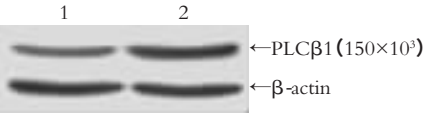


M:DNA 标准(DL 2000); 1:PCMV-HA-PLCβ1/*Eco*R Ⅰ + *Not* Ⅰ

图 3　质粒 PCMV-HA-PLCβ1 经 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切结果

2.5　瞬时转染细胞的 Western blot 结果

瞬时转染后,Western blot 检测 2 组 INS-1 细胞中 PLCβ1 蛋白的表达(图 4)。结果显示 2 组都出现预期大小的条带,而实验组此条带较明显。成功将 PCMV-HA-PLCβ1 瞬时转染到 INS-1 细胞。



1: 对照组; 2: 实验组

图 4　Western blot 检测 PLCβ1 在 INS-1 细胞中的表达

2.6　INS-1 细胞培养上清液的胰岛素含量

分别用 40 mmol/L 葡萄糖刺激 2 组瞬时转染的 INS-1 细胞 60 min,收集细胞培养上清液,检测胰岛素含量。与转染空载体的对照组(0.740 ± 0.091) ng/ml 相比,过表达 PLCβ1 的实验组为(1.906 ± 0.080) ng/ml,胰岛素含量明显增加($P < 0.01$)。

3　讨论

PLC 作为磷脂酰肌醇信号转导途径中的关键酶,其结构、分布、活化及功能一直是研究热点。磷脂酰肌醇信号转导通路在细胞分裂、代谢、运动、分泌、内吞及趋化等生命活动中发挥重要的作用。先前 Thore 等[2]提出 PLC 参与 GSIS 信息传递,使经典的 GSIS 通路得到补充。Thore 等研究发现:①当细胞内的钙离子浓度增加时,PLC 被激活,引起细胞膜上的磷脂酰肌醇二磷酸(PIP_2)水解为三磷酸肌醇(IP_3)和二酰基甘油(DAG);②IP_3与内质网上的 IP_3受体结合后,内质网上的配体门控钙离子通道开放,内质网中的钙离子进入细胞质中,胞质内的钙离子浓度增加,而内质网中钙离子浓度的下降引起细胞膜上的电压敏感性钙离子通道(SOC)开放,细胞内的钙离子浓度进一步增加;③DAG 通过活化磷激酶 C(PKC),引起下游蛋白质磷酸化而诱发胰岛素的释放。

至今在哺乳动物中已鉴定出15种PLC亚型,根据其不同的氨基酸序列分为6大类:PLCβ、PLCγ、PLCδ、PLCε和新近发现的PLCζ[5]及PLCη[6]。其中PLCβ有PLCβ1、PLCβ2、PLCβ3和PLCβ4 4种亚型;PLCγ有PLCγ1和PLCγ2 2种亚型;PLCδ有PLCδ1、PLCδ2、PLCδ3和PLCδ4 4种亚型;PLCη有PLCη1、PLCη2 2种亚型;PLCε有PLCε1、PLCε2 2种亚型。随着对PLC分类的细化,何种PLC亚型在GSIS中发挥作用呢? Akgoz[3]和Kim等[4]指出大鼠胰岛β细胞有PLCβ1表达。

基础研究显示,INS-1细胞胰岛素分泌阈、最大分泌强度和分泌曲线的趋势与人类胰岛β细胞相似,所以广泛用于研究GSIS机制。Kibbey等[7]用INS-1细胞研究线粒体GTP在GSIS中发挥的作用,Pi等[8]以INS-1细胞为对象研究发现活性氧簇是GSIS信息转导途径中重要的调节因子。因此,本实验以INS-1细胞为研究对象,拟探讨PLCβ1在葡萄糖刺激胰岛素分泌信息传递中的作用。首先本实验设定了葡萄糖刺激的浓度梯度和时间梯度,检测在各个刺激条件下INS-1细胞培养上清液中胰岛素含量,绘制INS-1细胞胰岛素分泌曲线,曲线显示40 mmol/L葡萄糖刺激INS-1细胞60 min,胰岛素分泌量最大;其次构建了PLCβ1真核表达载体,瞬时转染到INS-1细胞中,40 mmol/L葡萄糖刺激60 min后,测细胞培养上清液中胰岛素含量,结果显示过表达PLCβ1显著提高INS-1细胞的胰岛素分泌。由此推断,在GSIS信息传递机制中,PLCβ1发挥了一定的作用。

参考文献:

[1] Zawalich W S, Bonnet-Eymard M, Zawalich K C. Insulin secretion, inositol phosphate levels, and phospholipase C isozymes in rodent pancreatic islets[J]. Metabolism, 2004, 49(9): 1156-1163.

[2] Thore S, Dyachok O, Gylfe E, *et al*. Feedback activation of phospholipase C *via* intracellular mobilization and store-operated influx of Ca^{2+} in insulin-secreting beta-cells[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 19): 4463-4471.

[3] Akgoz M, Azpiazu I, Kalyanaraman V, *et al*. Role of the G protein gamma subunit in beta gamma complex modulation of phospholipase Cbeta function[J]. J Biol Chem, 2002, 227(22): 19573-19578.

[4] Kim S S, Jun K, Jeong M, *et al*. Immunohistochemical localization of eight phospholipase C isozymes in pancreatic islets of the mouse[J]. Exp Mol Med, 2001, 33(3): 164-168.

[5] Swann K, Saunders C M, Rogers N T, *et al*. PLCzeta (zeta): a sperm protein that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals[J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(2): 264-273.

[6] Zhou Y, Wing M R, Sondek J, *et al*. Molecular cloning and characterization of PLC-eta2[J]. Biochem J, 2005, 391(Pt 3): 667-676.

[7] Kibbey R G, Pongratz R L, Romanelli A J, *et al*. Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion[J]. Cell Metab, 2007, 5(4): 253-264.

[8] Pi J, Bai Y, Zhang Q, *et al*. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1783-1791.

(编辑 栾 嘉)

(上接1470页)

无感觉,临床症状主要有阴茎疼痛、弯曲和无力完成性生活。体检可见阴茎背侧或两侧部有硬结,有轻度触压痛感,结节与周围皮肤无粘连,形态常不规则,边界清楚,呈团块状、条索状,多发者可呈不平整的串珠状结节。阴茎硬结症通常会影响性功能,导致勃起功能异常的主要原因是严重畸形、连痂状阴茎、心理因素影响以及阴茎血管功能受损[3]。根据病史和体检较容易诊断。

本病的治疗方法较多,但目前尚无公认疗效确切的方法。由于本病有自愈倾向,有报道高达50%以上,对早期患者首选保守治疗。我们采用吲哚美辛联合对氨基苯甲酸治疗早期阴茎硬结症患者15例,总体疗效比较满意。由于性交时疼痛是本病患者最大的心理负担,心理负担过重的患者肯定影响治疗效果,自愈概率也相对减少,所以疼痛的缓解可以明显增加患者战胜疾病的信心。吲哚美辛是非甾体抗炎药,是最强的前列腺素(PG)合成酶抑制剂之一,它可以抑制红细胞和血小板凝集而发挥止痛和抗炎作用,而且吲哚美辛还可以增加胶原蛋白酶的合成,从而软化硬结,改善症状的目的。而对氨基苯甲酸治疗阴茎硬结症报道很多,疗效尚可,作用机制不明,可能是通过增加组织对氧的利用,增加单胺氧化酶的活性,减少组胺的释放从而减少纤维组织的形成。两者联合应用则可以显著地缓解患者的疼痛,软化疤痕,从而达到治疗的目的。但复发的患者第2次采用相同的方案治疗效果欠佳,而且复发的患者大多病情较重,原因不清,仍需我们进一步探讨。

关键词:吲哚美辛;对氨基苯甲酸;阴茎硬结症
中图法分类号:R697.17 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Hauck E W, Hauptmann A, Haag S M, *et al*. New insights into the etiological pathogenesis of Peyronie's disease[J]. Aktuelle Urol, 2003, 34(6): 387-391.

[2] Levine L A, Estrada C R, Storm D W, *et al*. Peyronie disease in younger men: characteristics and treatment results[J]. J Androl, 2003, 24(1): 27-32.

[3] Deveci S, Palese M, Parker M, *et al*. Erectile function profiles in men with Peyronie's disease[J]. J Urol, 2006, 175(5): 1807-1811.

(编辑 汪勤俭)