短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0850-02

瘦素对大鼠体外胰岛β细胞胰岛素合成与分泌的抑制作用

王丽红[1],陈锦凤[2],马红英[3],杨育清[4],林斌松[5],陈诺琦[6] (363000 福建 漳州,福建省漳州卫生职业学院:内科教研室[1],预防医学教研室[5];福建医科大学附属漳州市医院:内分泌科[2],检验科[4],内分泌科[6];福建省漳州医学科学研究所[3])

[摘要] **目的** 了解不同浓度瘦素对体外培养大鼠胰岛β细胞胰岛素合成与分泌的影响。**方法** 用含11.1 mmol/L葡萄糖的RPMI1640培养液体外培养大鼠胰岛β细胞系胰岛素-1(insulin-1,INS-1)细胞,实验分为5组,培养液瘦素浓度分别为0、5、10、20 μg/L和50 μg/L。培养24 h后分别以荧光定量PCR和ELISA方法检测胰岛β细胞前胰岛素原mRNA的表达及上清液胰岛素浓度。**结果** 在葡萄糖浓度11.1 mmol/L、瘦素作用24 h情况下,胰岛β细胞前胰岛素原mRNA表达随培养液瘦素浓度的升高而逐渐下降,上清液胰岛素浓度随培养液瘦素浓度的升高而逐渐下降,瘦素可抑制胰岛β细胞胰岛素的合成与分泌。**结论** 重组瘦素对体外培养大鼠胰岛β细胞(葡萄糖浓度11.1 mmol/L,瘦素作用24 h)胰岛素的合成与分泌具有抑制作用,随瘦素浓度的增加,抑制作用越明显。

[关键词] 瘦素;胰岛β细胞;胰岛素合成与分泌

[中图法分类号] R322.57;R335.6;R977.9 **[文献标志码]** A

2型糖尿病具有双重病理机制:胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷[1]。近年来探讨影响胰岛β细胞功能的相关因素,减少胰岛β细胞损伤及保护并恢复其功能的研究较多。瘦素是由脂肪细胞分泌的细胞因子,有广泛的生物学效应,可调节食欲和脂肪代谢、参与免疫功能的调控等[2],与糖尿病之间有着复杂深刻的联系。针对瘦素对胰岛β细胞胰岛素合成与分泌的影响及其作用机制的研究引起重视。本研究观察不同浓度瘦素在葡萄糖浓度11.1 mmol/L、瘦素作用24 h情况下对体外培养大鼠胰岛β细胞胰岛素合成与分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

大鼠胰岛β细胞系胰岛素-1(insulin-1,INS-1)细胞,由福建医科大学附属协和医院内分泌科馈赠;重组大鼠瘦素为武汉来福赛斯生物科技有限公司产品,培养液(含10%胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 kU/L链霉素、11.1 mol/L葡萄糖的RPMI1640培养液[3])由福建省漳州市医学科学研究所提供,ELISA试剂盒为武汉来福赛斯生物科技有限公司产品,Trizol试剂盒、RT-PCR试剂盒、荧光定量PCR仪FTC2000为上海闪晶分子生物科技有限公司提供。

1.2 胰岛细胞的培养

将大鼠INS-1细胞加入培养液,放入37℃和5% CO_2的培养箱内培养,并传代。实验分5组($n=5$),A组不加瘦素,B~E组分别加入瘦素,使培养液瘦素浓度分别为5、10、20 μg/L及50 μg/L。然后,继续培养24 h。吸出待检测细胞的培养液,离心取上清液,保存于-20 ℃冰箱供检测胰岛素用。

1.3 胰岛素浓度的测定

采用酶标法测定上清液中胰岛素的浓度。

1.4 胰岛β细胞前胰岛素原mRNA的表达的测定

待检测细胞用Trizol试剂盒提取总RNA。荧光定量PCR法检测胰岛β细胞前胰岛素原mRNA的表达。RT反应条件的设置:25 ℃ 10 min,40 ℃ 50 min,90 ℃ 5 min;荧光定量PCR扩增条件的设置:94 ℃ 3 min;94 ℃ 25 s,60 ℃ 30 s,循环45次;使用Primer Express软件设计引物探针:待测前胰岛素原mRNA的上游引物为5′-AGGAGCTCGAGGCGTTCAG-3′,下游引物为5′-GTCTTGGGTGGGTAGAGCAATC-3′;*Taq*Man探针fam + AGGCCAAACGTCACCGTCCCC + tamra。内参上游引物为5′-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3′,下游引物为5′-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3′,*Taq*Man探针fam + CTGAAGGGTGGGGCCAAAAG + tamra。得出的Ct值通过标准曲线获得实验组与内参组的相对拷贝数,根据实验组/内参组的相对拷贝数比值,对胰岛β细胞前胰岛素原mRNA的表达水平进行半定量分析。

1.5 统计学处理

各项数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Levene法检验方差齐性,多组间均数的比较用LSD法。采用SPSS 11.51统计软件进行分析。

2 结果

2.1 不同浓度瘦素对大鼠胰岛β细胞前胰岛素原mRNA表达的影响

培养液葡萄糖浓度为11.1 mol/L、瘦素作用时间24 h情况下,胰岛β细胞前胰岛素原mRNA表达随培养液瘦素浓度的升高而逐渐下降(表1)。对任何2组均值进行两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 不同浓度瘦素对大鼠胰岛β细胞胰岛素分泌的影响

培养液葡萄糖浓度为11.1 mol/L、瘦素作用时间24 h情况下,胰岛β细胞培养上清液胰岛素浓度随培养液瘦素浓度的升高而逐渐下降(表1)。对任何2组均值进行两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

[通信作者] 王丽红,电话:(0596)2559508,E-mail:377566153@qq.com

表1 不同浓度瘦素对胰岛β细胞前胰岛素原mRNA表达及胰岛素分泌的影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	前胰岛素原mRNA(μg/L)	上清液胰岛素浓度(μIU/ml)
A(0 μg/L)	0.471±0.021	35.1±1.6
B(5μg/L)	0.365±0.017[a]	31.2±0.9[a]
C(10 μg/L)	0.267±0.010[b]	27.4±0.5[b]
D(20 μg/L)	0.199±0.011[c]	26.8±0.7[c]
E(50 μg/L)	0.164±0.010[d]	25.4±0.5[d]

a:$P<0.05$，与A组比较；b:$P<0.05$，与B组比较；c:$P<0.05$，与C组比较；d:$P<0.05$，与D组比较

3 讨论

人口的老龄化及人们生活方式的改变，糖尿病特别是2型糖尿病发病率逐年上升。胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷是2型糖尿病发病机制中的两个重要环节。探讨影响胰岛β细胞功能的相关因素，减少胰岛β细胞损伤及保护并恢复其功能的研究近年来引起了重视。瘦素(leptin)是近年发现的由脂肪细胞分泌的细胞因子，对胰岛β细胞功能的影响主要体现在对胰岛素的直接调节作用。

国外学者通过静脉、脑室内及转基因方法注射瘦素，均观察到胰岛素敏感性提高。说明瘦素可在整体水平上促进胰岛素的功能[4,5]。国内谢锭等[6]及国外学者有关瘦素对离体大鼠胰岛分泌胰岛素的直接调节作用的研究中，同样的葡萄糖浓度和作用时间得出结果却不一样，目前仍存在争议。

本研究选择体外培养大鼠INS-1细胞，观察重组瘦素对胰岛β细胞胰岛素的合成与分泌的影响。以培养液葡萄糖浓度为11.1 mmol/L培养大鼠INS-1细胞，然后，将实验分为A、B、C、D和E 5组，培养液瘦素浓度分别为0、5、10、20 μg/L和50 μg/L。培养24 h后分别以荧光定量PCR和ELISA方法检测胰岛β细胞前胰岛素原mRNA的表达及上清液胰岛素浓度。结果显示，在葡萄糖浓度为11.1 mmol/L、瘦素作用时间24 h的情况下，瘦素对胰岛β细胞胰岛素的合成与分泌有抑制作用，并且随浓度增加抑制作用越明显。

瘦素抑制胰岛素分泌的机制可能与下列因素有关：①瘦素与胰岛β细胞上的瘦素受体结合以后，抑制前胰岛素的mRNA表达，降低胰岛素基因启动子转录活性，减少胰岛素的合成[7,8]。②瘦素与胰岛β细胞上的瘦素受体结合以后，通过激活ATP敏感的K^+通道而下调cAMP，抑制胰岛素的分泌[9]。③瘦素与胰岛β细胞上的瘦素受体结合以后，通过磷脂酰肌醇K^+(PI_3-K^+)途径激活K^{+ATP}通道，β细胞超极化，阻止Ca^{2+}内流，细胞质中Ca^{2+}浓度下降，从而阻止了胰岛素的分泌[7,10]。④瘦素与胰岛β细胞上的瘦素受体结合以后，可通过细胞内信号转导，激活磷脂酰肌醇(PI_3)K^+依赖性的环核苷酸磷酸二酯酶3B(PDE3B)、cAMP降解酶，从而降低cAMP，抑制胰岛素的分泌[11]。

肥胖和2型糖尿病患者由于瘦素水平降低或机体瘦素抵抗产生瘦素相对不足[12]。为了了解瘦素对血糖异常的糖尿病患者的胰岛β细胞功能的影响，本研究选择培养液葡萄糖浓度为11.1 mmol/L。瘦素分泌呈日周期变化，为了了解瘦素长时间作用对胰岛β细胞胰岛素合成与分泌的影响，本课题选择了24 h进行研究，结果显示瘦素长时间作用可抑制胰岛素的合成与分泌。瘦素抑制胰岛素合成与分泌，减少高胰岛素血症，从而保护胰岛β细胞的储备功能，延缓β细胞功能衰竭。另一方面，瘦素可阻止胰岛β细胞脂质沉积诱发的细胞凋亡，对脂质毒性产生保护作用。瘦素还可调节食欲和脂肪代谢，提高胰岛素的敏感性，在整体水平上促进胰岛素的功能。

参考文献：

[1] 李颖，刘东方. 早相胰岛素分泌缺陷在2型糖尿病发病机制中的作用[J]. 重庆医学，2007，36(3)：280－282.
[2] 周张章，周才琼，赵国华，等. 瘦素与肥胖的关系[J]. 中国临床保健杂志，2005，8(1)：85－87.
[3] 姜友昭，张玲，郑江，等. 不同葡萄糖浓度对INS-1细胞PPARδ表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(3)：247－249.
[4] Pankov IuA，Chekhranova M K，Karpova S K. The interconnections of molecular mechanisms of hormone actions and their role in pathogenesis of obesity，insulin resistance，and diabetes mellitus[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk，2008，(3)：28－36.
[5] Chen Y，Ohmori K，Mizukawa M，*et al*. Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type Ⅱ diabetes[J]. Circ J，2007，71(1)：144－152.
[6] 谢锭，程桦，傅茂，等. 瘦素对离体大鼠胰岛分泌胰岛素的双向影响[J]. 中华内分泌代谢杂志，2002，18(3)：191－193.
[7] 邬楠，谭焕然. 瘦素受体的分子生物学研究进展[J]. 大连医科大学学报，2004，26(2)：148－151.
[8] 李剑，陆菊明，潘长玉. 瘦素与葡萄糖代谢的关系[J]. 国外医学：内分泌学分册，2000，20(6)：314－317.
[9] Borba-Murad G R，Vardanega-Peicher M，Galende S B，*et al*. Central role of cAMP in the inhibition of glycogen breakdown and gluconeogenesis promoted by leptin and insulin in perfused rat liver[J]. Pol J Pharmacol，2004，56(2)：223－231.
[10] 袁莉，安汉祥，邓秀玲，等. 瘦素对大鼠离体胰岛β细胞胰岛素分泌和Kir6.2基因表达的调节[J]. 中华内分泌代谢杂志，2004，20(3)：268－270.
[11] Szanto I，Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2000，97(5)：2355－2360.
[12] 潘云龙，朱妍，施发兴，等. 2型糖尿病患者血清leptin浓度的变化及其与胰岛素抵抗、β-细胞功能的关系[J]. 实用临床医药杂志，2005，9(9)：89－91，94.

（**收稿**：2009-10-29；**修回**：2009-11-19）
（编辑 张 维）