论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0558-04

肿瘤坏死因子-α拮抗瘦素抑制胰岛素合成及分泌作用的实验观察

张 阳[1],卢永辉[2],缪洪明[1],卢忠燕[1],甘立霞[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1],军事预防医学院劳动卫生学教研室[2])

【摘要】 **目的** 探讨在炎症情况下,瘦素(leptin)对胰岛β细胞胰岛素合成与葡萄糖刺激的胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)功能的影响。**方法** 在含5.5 mmol/L葡萄糖培养基中培养传代的大鼠胰腺癌细胞系(INS-1E)和大鼠原代分离的胰岛,经生理浓度leptin(0.5 nmol/L)或TNF-α(2 ng/ml)及高浓度leptin(10 nmol/L)与TNF-α(20 ng/ml)单独及联合处理48 h后,在基础葡萄糖(3.3 mmol/L)或高糖(16.7 mmol/L)中分别刺激1 h,放免法检测葡萄糖刺激的GSIS功能;用RT-PCR方法检测胰岛素原(proinsulin) mRNA表达水平,同时细胞经超声破胞后检测胞内胰岛素含量。**结果** 高浓度leptin(10 nmol/L)或TNF-α(20 ng/ml)单独刺激组与对照组以及低浓度leptin或TNF-α组相比,均可显著性抑制INS-1E细胞和原代胰岛的GSIS功能($P<0.05$),与之相应的是细胞内proinsulin mRNA水平以及胞内胰岛素含量亦显著降低($P<0.01$);但TNF-α + leptin联合刺激组中,胰岛素原mRNA水平及胰岛素蛋白含量均较leptin单独刺激并未进一步降低,反而有显著升高($P<0.05$),提示TNF-α具有拮抗leptin抑制胰岛素基因表达和分泌的作用。**结论** TNF-α可以干扰leptin对胰岛β细胞胰岛素合成和分泌的抑制作用。提示肥胖者体内升高的TNF-α可能通过拮抗leptin对胰岛素分泌的抑制作用,在肥胖伴随的高胰岛素血症的发生及葡萄糖代谢紊乱中具有重要作用。

【关键词】 瘦素;肿瘤坏死因子-α;葡萄糖刺激的胰岛素分泌;胰岛素原,胰岛素
【中图法分类号】 R335.6;R392.11 【文献标志码】 A

Antagonistic effect of TNF-α on leptin-mediated inhibition of insulin synthesis and secretion in INS-1E cells and rat pancreatic islets

Zhang Yang[1], Lu Yonghui[2], Miao Hongming[1], Lu Zhongyan[1], Gan Lixia[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Occupational Health, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the influence of leptin on pancreatic β cell insulin synthesis and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in inflammation. **Methods** INS-1E rat insulinoma cells and freshly isolated rat pancreatic islets cultured in glucose (5.5 mmol/L)-containing media were treated with leptin (0.5 nmol/L or 10 nmol/L), TNF-α (2 ng/ml or 20 ng/ml), or their combination (leptin 10 nmol/L and TNF-α 20 ng/ml) for 48 h. Then, the cells and islets were balanced with low-concentration glucose (3.3 mmol/L) for 1 h to test the base level of insulin secretion, and subsequently stimulated with high-concentration glucose (16.7 mmol/L) for 1 h to test GSIS by radioimmunoassay. The expression of proinsulin mRNA was determined by RT-PCR. Intracellular insulin contents were detected after ultrasonic cell disruption. **Results** High-concentration leptin (10 nmol/L) or TNF-α (20 ng/ml) significantly suppressed GSIS ($P<0.05$) and reduced the intracellular proinsulin mRNA level and insulin content ($P<0.01$) in INS-1E cells and pancreatic β cells. However, low-concentration leptin (0.5 nmol/L) or TNF-α (2 ng/ml) did not show such activities. Additionally, when the cultured INS-1E cells or islets were treated with high-concentration leptin (10 nmol/L) plus TNF-α (20 ng/ml), the intracellular proinsulin mRNA level and insulin content were not further decreased but significantly increased as compared with the results after high-concentration leptin (10 nmol/L) treatment ($P<0.05$), indicating that TNF-α may antagonize the inhibition effect of leptin on insulin synthesis and secretion. **Conclusion** TNF-α can interfere with leptin-mediated inhibition of insulin synthesis and secretion in pancreatic β cells, and TNF-α level increase may contribute to the genesis of hyperinsu-

【基金项目】 国家自然科学基金(30971082);全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H025)
【通信作者】 甘立霞,电话:(023)68752945,E-mail:ganlixia@yahoo.com

linemia and glucose metabolism disorder in people with obesity.

[Key words] leptin; TNF-α; GSIS; proinsulin; insulin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971082) and the International Cooperation Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H025). Corresponding author: Gan Lixia, Tel: 86-23-68752945, E-mail: ganlixia@yahoo.com

肥胖所致胰岛素抵抗是 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)的一个重要危险因素。研究表明肥胖患者体内存在高胰岛素血症及胰岛素敏感性下降[1]。目前,肥胖与 T2DM 发生的详细病理生理机制尚未完全阐明。前期研究证实,脂肪组织分泌的多种肽类激素和细胞因子与胰岛素抵抗、T2DM 及其并发症有着紧密联系[2]。其中,leptin 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)是肥胖者血浆中含量显著升高的 2 种细胞因子。瘦素(leptin)主要由白色脂肪组织产生和分泌,其在血液中的浓度与体质量呈正相关。leptin 或 leptin 受体基因缺陷(ob/ob,db/db)的小鼠具有典型的 T2DM 特征。leptin 主要通过调节中枢摄食行为控制体质量,调节能量平衡,但 leptin 对外周组织的直接作用对血糖恒定的维持同样十分重要[3]。在糖尿病 ob/ob 小鼠中外源性给予 leptin 后,在尚未引起其体质量及摄食量改变之前,便能够显著降低血浆胰岛素和血糖水平[4-6],表明 leptin 具有直接抑制胰岛素分泌的作用。肥胖者常常伴随高胰岛素血症和胰岛素抵抗状态,提示 leptin 抑制胰岛素分泌功能在肥胖者中缺失或被干扰。

肥胖同时也是机体的一种慢性炎症状态,大量炎症细胞浸润脂肪组织,产生 TNF-α、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-1(IL-1)等众多细胞因子,这些细胞因子与肥胖、胰岛素抵抗、T2DM 等的发生密切相关[6]。但炎症因子是否干扰 leptin 抑制胰岛素分泌的功能,从而在肥胖引起的高胰岛素血症的产生中发挥作用,尚不清楚。为此,我们在培养的胰腺癌细胞系 INS-1E 和大鼠原代胰岛中,观察了 TNF-α 和 leptin 单独或联合作用对胰岛 β 细胞前胰岛素原(proinsulin)基因的表达、胰岛素合成与葡萄糖刺激的胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

改良型 RPMI1640 培养基(HyClone),小牛血清(FBS HyClone),胰岛素放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所),蛋白质定量测定试剂盒(Bio-Rad),Trizol Reagent(Invitrogen),ReverTra Ace-α-(TOYOBO),人淋巴细胞分离液 LTS1077(TBD),胶原酶Ⅴ(Sigma),双硫腙(dithizone,DTZ,Sigma),丫啶橙(AO,Sigma),碘化丙啶(PI,Sigma)。

1.2 INS-1E 细胞的培养

大鼠胰腺癌 β 细胞系 INS-1E 由本室保存;在 RPMI1640 培养基(含 5.5 mmol/L 葡萄糖)中加入 10 mmol/L HEPES,1 mmol/L 丙酮酸钠,50 mmol/L β-巯基乙醇,100 U/ml 青霉素、链霉素,37 ℃,5% CO_2 培养,每 2 天换液,按1∶3正常传代培养。

1.3 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验

待细胞生长到对数生长期时,调整细胞浓度为 1×10^6/ml,细胞以 0.5×10^6/孔接种至 24 孔细胞培养板中,5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养过夜。次日,在含 2% 新生小牛血清培养基中,加入 leptin(0.5、10 nmol/L)或者 TNF-α(2、20 ng/ml),分为对照组、leptin 单独刺激组、TNF-α 单独刺激组、TNF-α + leptin 联合刺激组;继续培养 48 h 后,检测胰岛素分泌:先用不含糖的 Krebs-ringer 缓冲液[NaCl 129 mmol/ L, KCl 4.7 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $CaCl_2$ 2.5 mmol/L, $MgSO_4$ 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 5.0 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, BSA 0.1%(质量体积分数),调 pH 至 7.4]孵育 30 min,弃去上清;然后加入含 3.3 mmol/L 葡萄糖的 Krebs-ringer 缓冲液 0.5 ml,孵育 1 h,收上清;继续用含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 Krebs-ringer 缓冲液孵育 1 h,分别将 2 次的上清收集后置 -20 ℃保存。用放免法进行胰岛素浓度测定,结果按 mIU/L 表示,每一条件重复 3 次。

1.4 细胞内胰岛素含量的测定

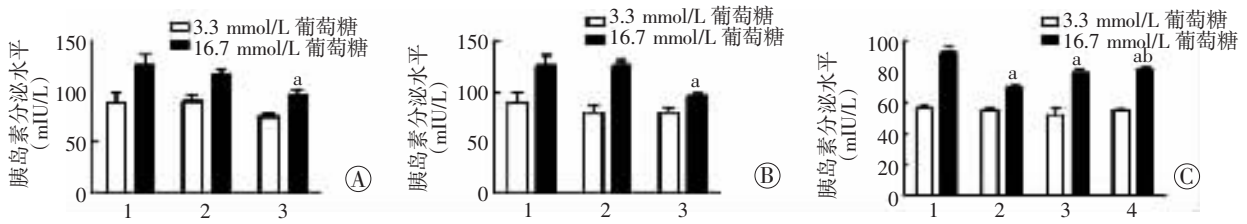
INS-1E 细胞接种及药物处理 48 h,胰酶消化后,PBS 洗 2 次,Krebs-ringer 缓冲液 200 μl 重悬细胞,冰浴超声破碎细胞(150 W,工作 9 s/间歇 9 s,共 3 min),12 000 r/min,4 ℃离心 10 min,收集上清置 -20 ℃保存,放免法进行胰岛素含量测定。同时采用 Bio-Rad 法测细胞裂解液中总蛋白浓度,各组细胞内胰岛素含量按 mIU/μg 表示。

1.5 半定量 RT-PCR

Trizol 试剂提取 INS-1E 细胞总 RNA,用逆转录试剂盒 ReverTra Ace-α-合成 cDNA 第 1 链。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):95 ℃ 变性 5 min;95 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 35 次;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,经凝胶成像系统扫描软件和灰度分析后,计算目的基因与 β-actin 光密度的比值,以对照组 proinsulin/β-actin 条带的灰度比值为 1,实验组/对照组比值用以表述 proinsulin 基因表达水平的相对变化情况。引物使用 Primer Premier 3.0 自行设计,引物序列为:proinsulin 产物长度为 231 bp,上游引物 5′-CCTGCCCAGGCTTTTGTCA-3′,下游引物 5′-GGTGCAGCACTGATCCACAATG-3′;β-actin 产物长度为 250 bp,上游引物 5′-GTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3′,下游引物 5′-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAGGG-3′,所有引物由上海英骏公司合成。

1.6 大鼠原代胰岛分离、纯化、培养

健康 8~10 周龄成年雄性 SD 大鼠 10 只,体质量 250~300 g,



a $P<0.01$，与对照组比较 b $P<0.05$，与10 nmol/L leptin单独刺激组比较 A：leptin单独刺激(1：对照组 2：0.5 nmmol/L leptin 3：10 nmmol/L leptin) B：TNF-α单独刺激(1：对照组 2：2 ng/ml TNF-α；3：20 ng/ml TNF-α)；C：leptin和TNF-α单独及联合刺激(1：对照组 2：10 nmol/L leptin单独刺激组；3：20 ng/ml TNF-α单独刺激组；4：leptin + TNF-α联合刺激组)

图1 leptin和TNF-α单独及联合作用对INS-1E细胞GSIS功能的影响

由第三军医大学实验动物中心提供。禁食16～18 h，腹腔注射10%水合氯醛麻醉，分离胆总管，经胆总管插管注入0.5 g/L胶原酶至胰腺完全充盈，37 ℃恒温水浴静止消化30 min，取出加入4 ℃ D-Hanks液终止消化，振荡数次，1 500 r/min离心2 min去上清，全培养基重悬，过100目筛网，1 500 r/min离心2 min，去上清，依次小心加入等体积淋巴细胞分离液和全培养基，以1 500 r/min离心10 min，收集界面层胰岛，D-Hanks液洗2次，DTZ和AO/PI鉴定胰岛纯度和存活率，显微镜下计数后以10个胰岛/孔加入48孔细胞培养板，以低糖RPMI1640培养基(5.5 mmol/L葡萄糖的+10%胎牛血清)于37 ℃，5% CO_2培养箱培养。实验分组及药物处理与细胞系INS-1E相同。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用GraphPad Prism 5.0作图分析软件，组间差异行 t 检验。

2 结果

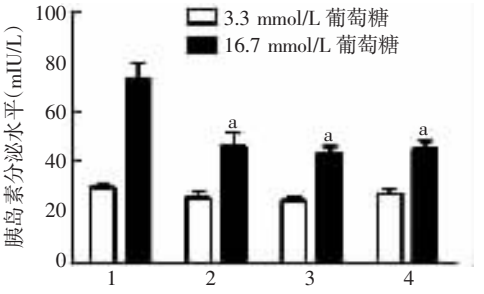
2.1 leptin和TNF-α单独及联合作用对GSIS功能的影响

首先在培养的INS-1E细胞中观察leptin和TNF-α单独及联合作用对GSIS功能的影响。0.5 nmol/L leptin刺激组和2 ng/ml TNF-α刺激组的GSIS分泌功能与对照组相比没有统计学差异($P>0.05$)，但10 nmol/L leptin刺激组和20 ng/ml TNF-α刺激组则显著降低GSIS功能($P<0.05$，图1A、B)。当用10 nmol/L leptin和20 ng/ml TNF-α联合刺激INS-1E细胞时，GSIS分泌功能与leptin和TNF-α单独刺激组相比却没有进一步降低(图1C)。

为了排除体外培养的传代细胞系在长期培养过程中可能导致的生物学功能改变，我们进一步分离纯化了大鼠的原代胰岛，DTZ染色鉴定胰岛纯度达90%，AO/PI荧光双标鉴定胰岛存活率达95%。显微镜下计数后以10个胰岛/孔加入48孔细胞培养板进行GSIS分泌测定。实验分组及药物处理与细胞系INS-1E相同。结果显示，在原代胰岛中leptin(10 nmol/L)或TNF-α(20 ng/ml)单独刺激与对照组相比均可显著抑制葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能($P<0.05$)。同样与培养的INS-1E细胞系相似，二者联合刺激时，GSIS功能并未进一步降低，提示TNF-α与leptin在葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能上存在拮抗的现象。见图2。

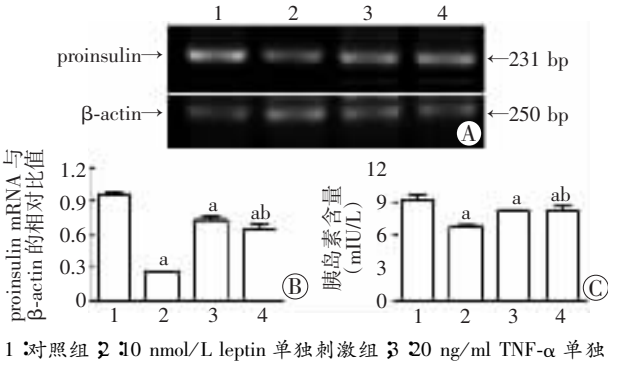
2.2 TNF-α与leptin在GSIS功能上相互拮抗的机制

进一步观察了TNF-α和leptin对GSIS功能的拮抗作用是否是通过对胰岛素原基因表达的影响发生的。在培养的INS-1E细胞中，提取总RNA，采用RT-PCR方法观察了leptin和TNF-α单独或联合处理48 h对胰岛素原mRNA水平的影响。结果显示：leptin和TNF-α单独刺激组的proinsulin基因的转录水平较对照组均显著下降($P<0.01$)；TNF-α + leptin联合刺激组中，胰岛素原mRNA水平较leptin单独刺激组显著升高($P<0.05$，图3A、B)，提示TNF-α具有拮抗leptin抑制胰岛素原基因表达的作用，但较TNF-α单独刺激组则没有统计学差异($P>0.05$)。



a $P<0.05$，与对照组比较 1：对照组 2：10 nmol/L leptin单独刺激组；3：20 ng/ml TNF-α单独刺激组 4：leptin + TNF-α联合刺激组

图2 leptin和TNF-α单独及联合作用对大鼠原代胰岛GSIS功能的影响



1：对照组 2：10 nmol/L leptin单独刺激组 3：20 ng/ml TNF-α单独刺激组 4：leptin + TNF-α联合刺激组

A：RT-PCR检测leptin、TNF-α单独及联合刺激对proinsulin mRNA表达水平的影响；B：RT-PCR定量分析；C：leptin、TNF-α单独及联合刺激对细胞内胰岛素含量的影响 a $P<0.01$，与对照组比较；b $P<0.05$，与10 nmol/L leptin单独刺激组比较

图3 leptin和TNF-α对INS-1E细胞胰岛素原mRNA转录和蛋白水平的影响

进一步采用放免法检测胞内胰岛素含量,结果显示:leptin和TNF-α单独刺激组较对照组胞内胰岛素含量显著下降($P<0.01$),leptin+TNF-α联合刺激组中,胰岛素的含量较leptin单独刺激显著升高($P<0.05$)(图3C),但较TNF-α单独刺激组则没有统计学差异($P>0.05$),进一步在蛋白水平证实TNF-α具有拮抗leptin抑制胰岛素蛋白表达的作用。

3 讨论

leptin是由脂肪细胞分泌的激素。研究报道胰岛β细胞表达长型的leptin受体[3],激活leptin受体能够通过激活ATP敏感的钾通道[7]及下调胰岛素原基因表达抑制胰岛素的合成与分泌[8-9]。胰腺特异的leptin受体基因敲除小鼠在高脂喂养下,其葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能受损,胰岛代偿性增生能力降低,导致糖耐量受损[10],从遗传学角度进一步证实了胰岛中leptin信号途径对于维持机体糖代谢稳态的重要性。本课题在培养的大鼠INS-1E及大鼠原代胰岛中,观察到TNF-α(20 ng/ml)和leptin(10 nmol/L)单独刺激与对照组比,均可显著性抑制胰岛素原mRNA的转录及胰岛素的蛋白水平,并显著抑制胰岛β细胞的GSIS功能($P<0.05$),这一结果与Kieffer等[7]在仓鼠β细胞系(HIT-T15)中观察到的现象一致。本研究进一步发现,当高浓度leptin与TNF-α联合作用时,胰岛素原mRNA水平及胰岛素蛋白含量均较leptin单独刺激并未进一步降低,反而有显著升高,提示leptin对胰岛素原基因的转录及胰岛素合成的抑制作用受到TNF-α的拮抗,表明TNF-α能够直接拮抗胰岛β细胞中leptin抑制胰岛素合成和分泌的功能。这一作用提示肥胖个体炎症水平的升高在高胰岛素血症及葡萄糖代谢紊乱中可能具有重要意义。

在肥胖导致的T2DM形成过程中,通常认为肥胖→胰岛素抵抗→高胰岛素血症是顺次发展的病理变化过程。然而在啮齿动物研究发现,采用药物干预或转基因的高胰岛素血症动物可以诱导胰岛素抵抗[11]。临床研究显示,高胰岛素血症可以发生在胰岛素抵抗之前并导致胰岛素抵抗发生[12-13]。Gray等[14]研究显示,在胰岛β细胞leptin信号缺陷的转基因小鼠($lepr^{flox/flox}$ RIPcre tg+)中,用二甲双胍改善其胰岛素抵抗,但并不能改善高胰岛素血症;反之给予降低胰岛素水平的二氮嗪,则能够增强胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗。表明高胰岛素血症发生在胰岛素抵抗之前,而胰岛素抵抗是因为过量胰岛素分泌而引起的继发症状。

本研究发现,高浓度leptin伴高浓度TNF-α时,leptin对胰岛素原基因的转录及胰岛素的合成的抑制作用显著减弱。我们将进一步从细胞信号转导、leptin受体表达水平及整体动物体上深入探讨TNF-α拮抗leptin作用的分子机制。该作用机制的阐明将对揭示肥胖导致的高胰岛素血症、胰岛素抵抗及T2DM的发生机制提供新的理论依据。

参考文献:

[1] Knowler W C, Fowler S E, Hamman R F, *et al*. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study[J]. Lancet, 2009, 374(9702):1677-1686.

[2] 黄坤,缪洪明,甘立霞. 脂肪细胞因子与胰岛素抵抗[J]. 国际内分泌与代谢杂志, 2009, 29(4):274-277.

[3] Emilsson V, Liu Y L, Cawthorne M A, *et al*. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion[J]. Diabetes, 1997, 46(2):313-316.

[4] Lam N T, Cheung A T, Riedel M J, *et al*. Leptin reduces glucose transport and cellular ATP levels in INS-1 beta-cells[J]. J Mol Endocrinol, 2004, 32(2):415-424.

[5] Seufert J, Kieffer T J, Habener J F. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(2):674-679.

[6] Heilbronn L K, Campbell L V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(12):1225-1230.

[7] Kieffer T J, Heller R S, Leech C A, *et al*. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic beta-cells[J]. Diabetes, 1997, 46(6):1087-1093.

[8] Tsiotra P C, Tsigos C, Raptis S A, *et al*. TNFalpha and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2001, 25(7):1018-1026.

[9] Laubner K, Kieffer T J, Lam N T, *et al*. Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of suppressor of cytokine signaling 3 in pancreatic beta-cells[J]. Diabetes 2005, 54(12):3410-3417.

[10] Morioka T, Asilmaz E, Hu J, *et al*. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice[J]. J Clin Invest, 2007, 117(10):2860-2868.

[11] Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de-Castro J, *et al*. Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocytic cell line:paracrine interaction with myocytes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(7):2866-2876.

[12] Weyer C, Hanson R L, Tataranni P A, *et al*. A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance:evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia[J]. Diabetes, 2000, 49(12):2094-2101.

[13] Rizza R A, Mandarino L J, Genest J, *et al*. Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man[J]. Diabetologia, 1985, 28(2):70-75.

[14] Gray S L, Donald C, Jetha A, *et al*. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling[J]. Endocrinology, 2010, 151(9):4178-4186.

(收稿:2010-11-03 修回:2010-12-07)

(编辑 王 红)