文章编号:1000-5404(2012)09-0879-04

论著

骨形态发生蛋白7对胰岛素分泌的影响及机制研究

姜友昭,曾 俊,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 探讨骨形态发生蛋白7(bone morphorgenetic protein 7,BMP7)对胰岛细胞胰岛素分泌的影响。**方法** Western blot检测小鼠胰岛细胞株MIN6中3种BMP7的Ⅰ型受体BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A的表达情况。将MIN6细胞分为4组:PBS对照组,重组人BMP7(rhBMP7)低、中、高剂量组(rhBMP7终浓度分别为10、50、100 ng/ml),每组设5个复孔。ELISA检测各组细胞培养基中的胰岛素分泌情况。激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度变化。**结果** BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A均表达于MIN6细胞。PBS对照组及rhBMP7低、中、高剂量组的胰岛素浓度分别为(0.42±0.11)、(0.63±0.22)、(0.82±0.19)、(1.24±0.26)ng/(ml·μg)。与对照组相比,rhBMP7低、中、高剂量组的胰岛素分泌均明显增加($P<0.05$)。PBS对照组及rhBMP7低、中、高剂量组的细胞内钙离子浓度增加分别为(3.5±2.1)%、(4.2±2.3)%、(5.1±3.5)%、(4.9±2.7)%,4组间差异不显著($P>0.05$)。**结论** BMP7可显著促进胰岛细胞的胰岛素分泌,其作用机制可能是调控非钙离子浓度依赖的胞吐环节。

[关键词] 骨形态发生蛋白7;胰岛素分泌;MIN6细胞
[中图法分类号] R335.6; R341; R363.27 [文献标志码] A

Bone morphorgenetic protein 7 improves insulin secretion from mouse pancreatic beta cell line MIN6

Jiang Youzhao, Zeng Jun, Chen Bing (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of bone morphorgenetic protein 7 (BMP7) on insulin secretion in pancreatic beta cells. **Methods** The expression of three type Ⅰ receptors of BMP7, BMPR1A, BMPR1B and ACVR1A, was detected by Western blotting in mouse pancreatic beta cell line MIN6. Then the MIN6 cells were treated respectively by PBS (control), low-, medium- and high-dose of rhBMP7 (final concentration of rhBMP7 was 10, 50, and 100 ng/ml). Then the insulin level of the culture media was detected by ELISA and the intracellular concentration of calcium was determined by laser confocal microscopy. **Results** BMPR1A, BMPR1B and ACVR1A were all expressed in the MIN6 cells. The insulin concentration of PBS, low-, medium- and high-dose rhBMP7 treatment was 0.42±0.11, 0.63±0.22, 0.82±0.0.19 and 1.24±0.26 ng/(ml·μg), respectively. The insulin concentration of rhBMP7 treatment groups was significantly higher than that of the control (all $P<0.05$). In the cells treated by PBS, low-, medium-, and high-dose rhBMP7, the intracellular calcium concentration was increased by (3.5±2.1)%, (4.2±2.3)%, (5.1±3.5)%, and (4.9±2.7)%, respectively. There was no statistical difference in these cells (all $P>0.05$). **Conclusion** BMP7 enhances insulin secretion significantly in pancreatic beta cells, which may be due to its regulation of calcium-independent exocytosis.

[**Key words**] bone morphorgenetic protein 7; insulin secretion; MIN6 cells

Corresponding author: Chen Bing, E-mail:chenbing3@medmail.com.cn

中国成人糖尿病患者可能已经达到9 240万[1],其中90%为2型糖尿病。目前2型糖尿病的发病机制虽尚未完全阐明,但胰岛素分泌不足在2型糖尿病发生过程中的重要作用已受到了广泛的关注[2-4]。了解胰岛素分泌的调控机制不但将为明确2型糖尿病的病因,也将为2型糖尿病的治疗提供新的线索。血液循环中的胰岛素分泌调控因子由于通过注射进入体内后,可通过血液循环直接到达胰岛,实现胰岛素分泌的调控而备受关注[5-6]。骨形态发生蛋白7(bone morphogenetic protein 7,BMP7)是一种存在于血液中、主要来源于肾脏的细胞因子。近年研究发现,BMP7除了具有调控胚胎发育、骨形成等作用外,其在肥胖和代谢

[通信作者] 陈 兵, E-mail:chenbing3@medmail.com.cn

性疾病的发病过程中也起着重要作用[7]。前期研究发现,在非糖尿病患者中,血清BMP7浓度与胰岛素分泌指数HOMA2-B%和空腹胰岛素水平正相关[8],但其具体因果关系尚不明确。有研究表明,BMP7的细胞内下游信号通路smads和p38MAPK均是胰岛素分泌的重要调控途径[9-10]。据此推测,BMP7可能是存在于血液中的促胰岛素分泌因子。本研究以小鼠胰岛细胞株MIN6细胞为对象,明确BMP7对胰岛素分泌的影响并初步探讨其机制,为了解2型糖尿病发病机制提供新线索,并为其治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

MIN6细胞购自美国ATCC公司,BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A、GAPDH抗体均购自美国Santa Cruz公司,DMEM培养基和胎牛血清购自HyClone公司,重组人骨形成蛋白7(rhBMP7)购自美国Prospec公司,Iodo-beads碘化试剂盒购自美国Pierce公司。Fluo-3/AM荧光试剂购自美国Biotium公司。

1.2 方法

1.2.1 MIN6细胞培养 细胞用含4.5 g/L D-葡萄糖、15%胎牛血清、3.4 g/L碳酸氢钠、584 mg/L L-谷氨酰胺、75 mg/L青霉素、50 mg/L链霉素和10 μl/L β-巯基乙醇的DMEM培养基培养,置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中孵育。

1.2.2 细胞分组处理 取对数生长期的MIN6细胞,分成4组:PBS对照组,rhBMP7低、中、高剂量组(rhBMP7终浓度分别为10、50、100 ng/ml),每组设5个复孔。

1.2.3 Western blot检测MIN6细胞BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A表达 将收集好的MIN6细胞提取蛋白,BCA法检测蛋白浓度。用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后电湿转至PVDF膜(Millipore)。用10%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,分别用BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A、GAPDH一抗4 ℃孵育过夜,每个蛋白分别检测3组。TBST洗膜后,加入相应二抗(1∶50 000)于室温孵育1 h。TBST洗膜3次。最后PVDF膜与化学发光底物于室温孵育反应5 min后,将PVDF膜放入凝胶成像仪中进行曝光、采集图片。

1.2.4 放射性配体结合实验检测BMP7与MIN6细胞结合

按Iodo-beads试剂盒说明书标记BMP7,生成^{125}I-BMP7。然后按照文献[11]报道制备MIN6细胞的细胞膜,将细胞膜定量后,进行放射性配体结合实验,反应介质为牛血清白蛋白Tris-HCl缓冲液。总结合管(TB)加入膜蛋白20 μg、^{125}I-BMP7(终浓度分别为50、100、400、1 000 pmol/L)及反应介质,总体积为100 μl。非特异结合管(NSB)加入膜蛋白20 μg、^{125}I-BMP7(终浓度分别为50、100、400、1 000 pmol/L)、过量150倍非标记rhBMP7及反应介质,总体积为100 μl。0~4 ℃保温2 h,加入30 μg牛γ-球蛋白及4 ℃预冷的聚乙二醇。0~4 ℃静置15 min,4 ℃ 3 500 r/min离心15 min,吸弃上清,沉淀置FH463A-自动定标器中计数。非特异结合管与总结合管平行操作,双管平行测定。总结合管减去非特异结合管为特异结合(SB)。重复3次。

1.2.5 ELISA法检测胰岛素浓度 取对数生长期细胞,用rhBMP7不同浓度处理24 h后,除去细胞培养基,先用PBS缓冲液洗2次,再用含有2 mmol/L葡萄糖的KRHB缓冲液孵育60 min,最后用含有16.7 mmol/L葡萄糖的KRHB缓冲液孵育45 min,取细胞上清液,参照试剂说明书,检测上清液中的胰岛素浓度,并将各孔细胞提取蛋白,测定细胞蛋白含量,做胰岛素分泌蛋白校正。

1.2.6 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度变化 用DMSO和Hanks液将Fluo-3/AM配成20 μmol/L的负载液。各组细胞均用温浴过的含Ca^{2+} Hanks液洗涤3次,加入含Ca^{2+} Hanks液及其配制的Fluo-3/AM液,于37 ℃避光孵育45 min,吸去负载液,并用含Ca^{2+} Hanks液洗涤3次,加入含Ca^{2+} Hanks液进行细胞检测。在激光扫描共聚焦显微镜程序下对细胞平面进行扫描。计算细胞平面内平均荧光强度,以平均荧光强度代表细胞内钙浓度。连续观察施加因素前后细胞内钙浓度荧光强度变化,按公式计算:细胞内钙浓度荧光强度增加率=(Fmax-F0)/F0×100 %。式中Fmax表示施加因素后细胞内钙浓度变化最大时的荧光强度,F0表示施加因素前细胞内钙浓度荧光强度。

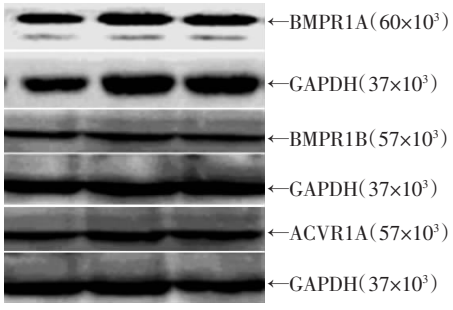
1.3 统计学方法

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 MIN6细胞的BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A表达情况

Western blot检测发现,BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A均表达于MIN6细胞,且均具有较高的表达丰度(图1)。



1~3:设置的3个复孔

图1 Western blot检测MIN6细胞中BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A的表达

2.2 BMP7可与MIN6细胞膜结合

采用放射性配体结合实验发现,rhBMP7可与MIN6细胞膜结合。随着^{125}I-BMP7浓度的增加,结合的^{125}I-BMP7也明显增加,在^{125}I-BMP7为2.5 nmol/L时呈现饱和状态,最大结合容量为12 ng/mg膜蛋白。

2.3 BMP7可促进胰岛细胞的胰岛素分泌

给予各处理因素24 h后,PBS对照组的胰岛素浓度为(0.42±0.11)ng/(ml·μg),BMP7低、中、高剂量组的胰岛素浓度分别为(0.63±0.22)、(0.82±0.19)、(1.24±0.26)ng/(ml·μg)。与对照组相比,rhBMP7低、中、高剂量组的胰岛素分泌均明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

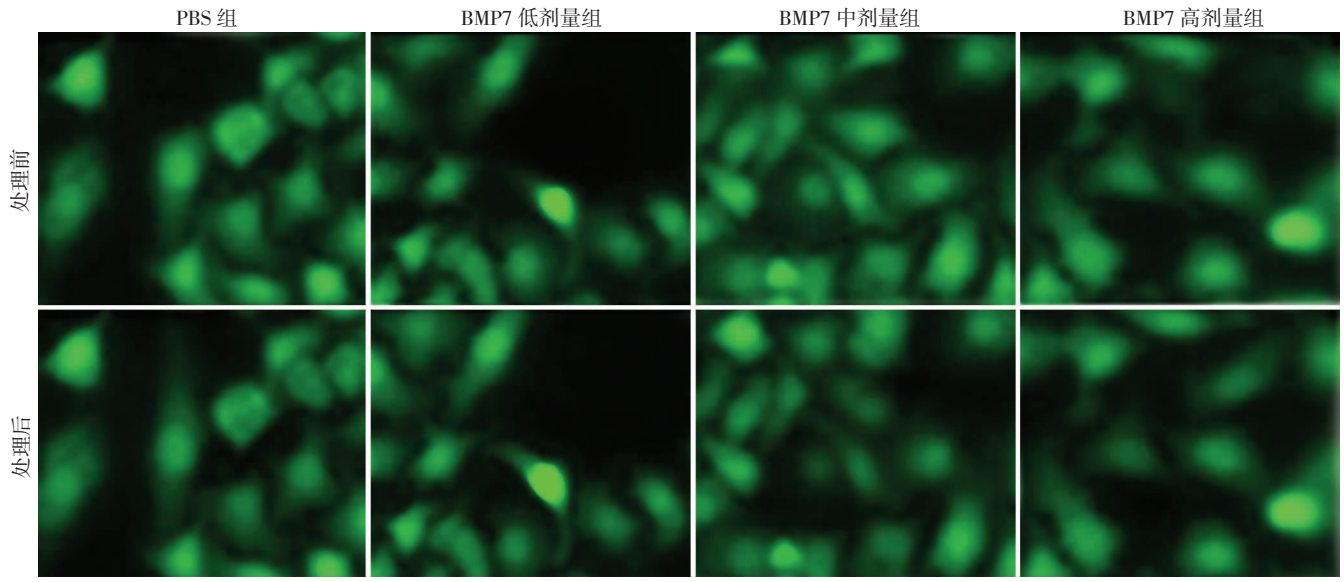


图 2 BMP7 对 MIN6 细胞内钙离子浓度无影响 （荧光显微镜 ×400）

2.4 BMP7 对 MIN6 细胞内钙离子浓度无明显影响

激光共聚焦显微镜观察发现 PBS 组处理前后荧光强度增加为(3.5 ±2.1)%，rhBMP7 低、中、高剂量组的荧光强度增加分别为(4.2 ±2.3)%、(5.1 ±3.5)%、(4.9 ±2.7)%。4 组的荧光强度增加量差异不显著($P>0.05$，图 2)，表明 BMP7 对细胞内钙离子浓度无明显影响。

3 讨论

BMP7 是 TGFbeta 超家族的一员，在人体中，主要来源于肾脏、软骨、眼睛等器官[12-13]，分泌入血后，可以与靶器官中的相应受体结合从而发挥生物学效应。除了在胚胎发育、炎症等方面的作用外，TGFbeta 超家族在代谢性疾病发生中的作用也日益引起人们的关注。近年研究发现，BMP7 可以调控棕色脂肪细胞的生成和能量消耗，可能作为肥胖等代谢性疾病的治疗靶点[14]。我们前期研究发现血清 BMP7 浓度与胰岛素分泌正相关，但其因果关系仍需进一步探寻。

要发挥其生物学效应，BMP7 首先要与其受体结合。研究发现，可以与 BMP7 结合的 I 型受体包括 BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A 亚型[15-16]，BMP7 结合的 I 型受体类型决定了其型号传递的特异性。本研究首先检测了 MIN6 细胞中 3 种 I 型受体的表达情况，发现 BMPR1A、BMPR1B、ACVR1A 3 种 I 型受体均表达于 MIN6 细胞，且均具有较高的表达丰度，进一步放射性配体结合实验提示 BMP7 可与胰岛细胞膜特异性结合，这也为 BMP7 的促胰岛素分泌作用提供了生物学基础。然后检测了 BMP7 对 MIN6 细胞的胰岛素分泌的影响，发现，不管是低剂量、中剂量，还是高剂量，rhBMP7 均可以明显促进 MIN6 细胞的胰岛素分泌，且其促胰岛素分泌作用呈现出一定的剂量依赖关系，充分表明 BMP7 具有直接的胰岛素促泌作用。

胰岛 β 细胞的胰岛素分泌调控主要分为对细胞内的第 2 信使物质水平的调节(近端步骤)和对胞吐机制本身的调节(末端步骤)。其中近端步骤主要受 Ca^{2+} 内流调节，而末端步骤的胞吐除了受 Ca^{2+} 内流调节外，还存在非 Ca^{2+} 依赖的调节机制[10]。多个研究提示 BMP7 的下游途径 smads 和 p38MAPK 均是胰岛素分泌调控的重要因子。其中 smads 途径的胰岛素分泌作用则通过调节 Kir6.2、SUR1 等基因表达从而导致 Ca^{2+} 内流增加而实现[17-18]。而 p38δMAPK 可以通过直接和蛋白激酶 D 1(PKD1)结合，磷酸化 PKD1 的 Ser397 及 Ser401 位点从而抑制其活性，而 PKD1 是介导反式高尔基体网(TGN)胰岛素囊泡分裂，从而导致非 Ca^{2+} 浓度依赖胞吐的关键分子。目前 p38δMAPK-PKD1 途径调控的非 Ca^{2+} 浓度依赖的胞吐在胰岛素分泌中的关键作用已经被证实[9]。为了初步探索 BMP7 调控胰岛素分泌机制，我们检测了 BMP7 干预条件下细胞内钙离子的浓度变化，结果发现，PBS 对照组和 BMP7 低、中、高剂量组的细胞内钙离子浓度均无显著差异，说明 BMP7 的促胰岛素分泌作用在于非钙离子依赖的胞吐环节，且其作用很可能通过 p38δMAPK-PKD1 途径实现。

综上所述，BMP7 可以促进胰岛细胞的胰岛素分泌，其作用环节可能在于非钙离子依赖的胞吐环节。下一步研究将通过体内实验进一步明确 BMP7 的促胰岛素分泌作用，同时进一步探讨其分子机制。

参考文献：

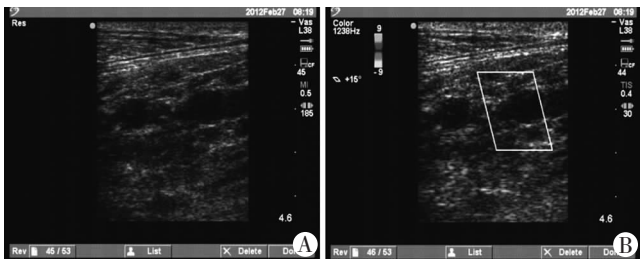
[1] Yang W, Lu J, Weng J, *et al*. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.

[2] Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, *et al*. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes

risk[J]. Nat Genet, 2010, 42(2): 105-116.
[3] Voight B F, Scott L J, Steinthorsdottir V, *et al*. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis [J]. Nat Genet, 2010, 42(7): 579-589.
[4] Wajchenberg B L. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment[J]. Endocr Rev, 2007, 28(2): 187-218.
[5] Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, *et al*. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism[J]. Cell, 2010, 142(2): 296-308.
[6] Huising M O, van-der-Meulen T, Vaughan J M, *et al*. CRFR1 is expressed on pancreatic beta cells, promotes beta cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(2): 912-917.
[7] Schulz T J, Tseng Y H. Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 523-531.
[8] Zeng J, Jiang Y, Xiang S, *et al*. Serum bone morphogenetic protein 7, insulin resistance, and insulin secretion in non-diabetic individuals [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93(1): e21-e24.
[9] Lin H M, Lee J H, Yadav H, *et al*. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function[J]. J Biol Chem, 2009, 284(18): 12246-12257.
[10] Sumara G, Formentini I, Collins S, *et al*. Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis[J]. Cell, 2009, 136(2): 235-248.
[11] Hawes B E, Kil E, Green B, *et al*. The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways[J]. Endocrinology, 2000, 141(12): 4524-4532.
[12] 方针强，刘永亮，王祥卫，等. hBMP-7修饰的骨髓间充质干细胞对肾脏BMP-7的影响[J]. 第三军医大学学报，2011，33(15)：1590-1593.
[13] 方针强，叶钢，欧阳一辛，等. 人BMP-7基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2008，30(2)：153-156.
[14] Tseng Y H, Kokkotou E, Schulz T J, *et al*. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure[J]. Nature, 2008, 454(7207): 1000-1004.
[15] 徐慧慧，齐艳丽，顿嵩，等. 骨形成蛋白7通过激活Ⅰ型受体BMPR1A、BMPR1B抑制肺大细胞癌NCI-H460细胞的增殖[J]. 中国肺癌杂志，2010，13(7)：659-664.
[16] 武鹏宇，戴立里，唐静，等. 骨形态发生蛋白-7对人肝星状细胞转化生长因子β信号转导的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(13)：1433-1437.
[17] Goulley J, Dahl U, Baeza N, *et al*. BMP4-BMPR1A signaling in beta cells is required for and augments glucose-stimulated insulin secretion [J]. Cell Metab, 2007, 5(3): 207-219.
[18] Bertolino P, Holmberg R, Reissmann E, *et al*. Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(20): 7246-7251.

（收稿：2011-12-05；修回：2012-02-19）
（编辑　栾　嘉）

（上接878页）



A：小腿肌间静脉扩张；B：管腔内无彩色血流信号

图1　典型急性期小腿肌间静脉丛血栓形成彩色多普勒声像表现

确诊患者经溶栓、抗凝、抗血小板聚集治疗后，症状逐渐缓解，血栓于2～12周后逐渐变小乃至消失，血流信号发生改变：由无→少量→与健侧基本相同。11例合并主干深静脉血栓者分别于6～12周后肌间静脉血栓消失，主干静脉血栓部分消失。

3　讨论

小腿肌间静脉丛位于小腿背侧、腹侧肌群中，与大腿内收肌静脉丛和跖静脉丛同属于下肢深静脉丛，其中小腿肌间静脉丛血栓发病率最高[2]，是因为小腿肌间静脉管腔细小，周围缺少深筋膜等坚硬组织包绕，血液回流阻力大，管腔容易扩张，易诱发血栓形成。

本组病例中87例有外伤、手术及长期卧床病史等，外伤和手术可引起血小板增多，凝血因子增加，血液呈现高凝状态，而长期卧床患者由于肢体活动受限，肌肉泵功能减低，静脉血流缓慢，在瓣膜处易有涡流发生，从而导致静脉丛血栓形成。对有以上病史的患者肢体出现肿痛需行超声检查时，除常规检查下肢主干深静脉，还不能忽略小腿肌间静脉丛的检查。国外有学者指出如不进行小腿肌间静脉检查，将有40%的孤立性小腿静脉血栓被漏诊[3]。由于小腿肌间静脉丛管腔较细，回流速度慢，基本不影响主干静脉的回流，所以小腿症状多不明显，常被忽略而影响诊断和治疗。部分患者血栓会向主干深静脉扩展，严重者引起肺血栓栓塞，因此检查时探头要轻压，避免用力。

另外在检查中发现，有一些患者的肌间静脉管腔明显增宽，内出现流动性自发显影，探头加压管腔能完全闭合，应用探头加压或屈趾活动数次后这种自发显影可消失。在检查主干静脉中也会遇到这种情况，出现该现象的原因可能是静脉回流速度较慢，血液淤滞，红细胞散射信号被捕捉。由于这些患者没有临床症状，是否需要抗凝治疗，有待进一步观察。

参考文献：

[1] 周永昌，郭万学. 超声医学[M]. 4版. 北京：科学技术文献出版社，2002：810-812.
[2] 裴玉昆. 周围血管病学[M]. 北京：北京科学技术出版社，1993：308-309.
[3] Labropoulos N, Webb K M, Kang S S, *et al*. Patterns and distribution of isolated calf deep vein thrombosis[J]. J Vase Surg, 1999, 30(5): 787-791.

（收稿：2012-02-09；修回：2012-04-09）
（编辑　栾　嘉）