维普资讯 http://www.cqvip.com

An experimental model of delayed cerebral injury induced by subacute carbon monoxide intoxication in mice

Yang Junqing, et al
Department of pharmacology, college of basic medical sciences

The experimental model of delayed cerebral damage was established in mice via CO 1ml/10g wt i.p, once a day, continuously 7 days. In the test of the passive avoidance task, we investigated the impairment of learning and memory function after CO exposure and the delayed neuronal death in hippocampus of mice. The model is simple, reliable, and safe, It perhaps becomes an effective model for us to illustrate the mechanism of delayed injury induced by CO.

KEY WORDS CO; cerebral injury; learning and memory; Model

335-337 (3)

胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞模型的建立和鉴定

R587.1
R735.7

临床学院内分泌科 李晨钟* 张素华 舒昌达
病毒性肝炎研究所 张大志

提 要 本文介绍了高胰岛素诱导培养法复制原代大鼠肝细胞及HepG2肝癌细胞的胰岛素抵抗模型的方法。该方法可明显降低两类细胞的胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用能力，导致胰岛素抵抗，而且简便、易行、重复性好，成功率高，可广泛应用于胰岛素抵抗的研究。

关键词 胰岛素抵抗；细胞模型；肝细胞 肝肿瘤细胞
中图分类号 R587.1

胰岛素抵抗(insulin resistance IR)是一种与多种疾病的发生、发展密切相关的重要病理生理状态[1]。由于IR的研究常常需要取肝脏、骨胳肌等胰岛素靶组织，使在人体的研究不易广泛开展，因此目前国外的大多数IR研究以细胞或动物模型为对象[2,3]，尤其是IR细胞模型，因具有复制周期短、易多次重复、影响因素易控制及价格相对低廉等优点，已被较为广泛的使用。但国内目前尚无IR细胞模型的报道。近来，我们采用高浓度胰岛素诱导培养法复制成功两种IR细胞模型：Wistar大鼠原代肝细胞模型和HepG2肝癌细胞模型。现报道如下：

1 材料和方法

1.1 化学试剂和药品 DMEM培养基、牛血清白蛋白(BSA)、胰蛋白酶及新生小牛血清(美国GIBCO BRL产品)，Ⅳ型胶原酶及D－葡萄糖(美国Sigma产品)，基因工程人胰岛素(美国Lilly产品)，^{3}H－D－葡萄糖(中科院上海原核子研究所，比放射性8 Ci/mmol)，A_{14}－^{125}I单碘猪胰岛素(华西糖尿病应用科技开发研究所，比放射性4×10^7～7×10^7 GB q/mol)，POP和POPOP(上海生化试剂供应站，进口分装产品)，Hank's缓冲液及磷酸缓冲液为我室自配，其余各种化学试剂均为市售分析纯。

1.2 实验动物 雄性成年Wistar大鼠(重庆医科大学实验动物中心)，年龄60～90d，体重250～300g，常规鼠粮喂养，经饮水器自由饮水。

1.3 IR原代大鼠肝细胞模型复制和鉴定

1.3.1 大鼠肝细胞的分离和培养，按文献进行[4]，简述如下：将大鼠用戊巴比妥钠腹腔麻醉(50mg/kg体重)后，打开腹腔进行肝脏灌洗。先用400ml含EDTA(5mM)葡萄糖(5.5mM)的去Ca^{2+} Hank's(pH值7.4)缓冲液反复灌洗，然后用200毫升含$CaCl_2$(2mM)和胶原酶(100mg/150ml)的Hank's液反复灌洗。然后取下大鼠肝脏，夹住肝静脉主干将其转移至培养皿中(装有50ml含胶原酶的缓冲液)，于37°C培养10分钟，随后将细胞经一孔径约6μm的尼龙筛网滤过，并用4°C的Hank's缓冲液(40ml)冲洗四次。将滤过的细胞用含有2nM丙酮和1%BSA的磷酸缓冲液重新悬浮，并将pH值

• 男，1971－01出生，博士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

调至7.4，于37°C培养10分钟。然后将细胞悬液离心，并用相同成分的磷酸缓冲液重新悬浮沉淀和调节细胞浓度，一般在1～2×10⁶细胞/毫升为宜。

1.3.2 IR原代大鼠肝细胞模型复制。按文献进行，稍作改进[4]。将制备的大鼠肝细胞悬液用4°CDMEM培养液(含30%小牛血清，50μg/ml青霉素，50U/ml链霉素，2mmol/l谷氨酸，12mmol/l碳酸氢钠及25mmol/l葡萄糖)洗涤一次，以灭活胶原酶，然后用不含小牛血清的DMEM(其余成分同上，且以后使用的培养液均同此)洗涤两次以除去血清蛋白。将细胞转移至培养皿中，并用培养液将细胞浓度调至1.5×10⁵/2ml为宜。经37°C，5%CO_2至少孵育5小时，再用培养液洗涤一次。然后加入1ml新配制的含有或不含有5×10^{-7} mol/L人胰岛素的培养液(不加胰岛素者为对照)于37°C，5%CO_2孵育16小时，再用不含胰岛素的培养液洗涤2次，共二十分钟。

1.3.3 IR原代大鼠肝细胞模型鉴定。采用³H－D－葡萄糖掺入实验评价细胞的胰岛素敏感性，按文献进行[5]。将经过16小时孵育的细胞加入1ml DMEM培养液(分别含1ng/ml，10ng/ml，50ng/ml，100ng/ml，200ng/ml人胰岛素或不含人胰岛素)于37°C预孵育半小时，然后加入³H－D－葡萄糖(1.3μCi/ml培养液)于37°C，5%CO_2条件下孵育1小时，并通过加入冰冷的磷酸缓冲液快速洗涤细胞以终止反应。细胞用0.5ml 20%KOH融解后，转移至玻璃试管中。取出100μl细胞融解液测定蛋白质浓度。向玻璃试管中加入2倍体积冷乙醇(660μl/ml)溶液洗涤两次。离心后弃去上清液，将沉淀物(糖原)倒置沉积在直径2厘米的滤纸片上。滤纸片经4°C，660μl/ml乙醇搅拌洗涤四次，共三小时。将滤纸片烤干后，置于10ml闪烁液中用液体闪烁仪(Beckman LS 1801)测定放射性计数(膜片法，闪烁液为二甲苯或甲苯的PPO－POPOP系统。根据³H－D－葡萄糖的比放射性，细胞融解液的蛋白质浓度及糖原的放射性计数，可计算出³H－D－葡萄糖掺入率，单位为nmol葡萄糖mg蛋白质$^{-1}$，小时$^{-1}$。

1.4 IR HepG2肝癌细胞模型复制和鉴定

1.4.1 HepG2肝癌细胞的培养。 HepG2肝癌细胞由中科院上海肿瘤研究所提供，按常规方法培养[6]，用DMEM培养液培养(成分同上)。消化液采用胰蛋白酶、EDTA消化液，胰蛋白酶终浓度为0.125%，用培养液调节细胞浓度至1×10^6/ml。

1.4.2 IR HepG2肝癌细胞的复制和鉴定。方法与IR原代大鼠肝细胞基本相同。

1.5 统计学处理 数据均以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$)。两组间比较采用Student t检验，多组间比较Newman－keuls检验。

2 结果

2.1 原代大鼠肝细胞和HepG2肝癌细胞的³H－D－葡萄糖掺入率

由表1可见，在培养液中不含胰岛素的基础状态下，高胰岛素细胞的葡萄糖掺入率与对照细胞并无差异。向培养液中加入胰岛素后，高胰岛素细胞的葡萄糖掺入率在各种浓度的胰岛素刺激下，均显著低于对照细胞。此外，高胰岛素细胞和对照细胞的葡萄糖掺入率在加入胰岛素后虽然均升高，但前者升高的幅度显著低于后者。表1还显示，原代鼠肝细胞(包括对照细胞和高胰岛素细胞)的葡萄糖掺入率在基础状态和胰岛素刺激状态，均显著高于HepG2肝癌细胞。

2.2 ³H－D－葡萄糖掺入实验的评价

本研究的³H－D－葡萄糖掺入实验的批内变异系数为4%～8%，批间变异系数为6%～10%。

3 讨论

IR是指超常量胰岛素才能够引起正常量反应的一种状态，常常伴有高胰岛素血症。由于研究表明，高血压、糖尿病、肥胖、冠心病及高脂血症等疾病患者常常具有IR，因此研究IR发生的机制对阐明这些常见病的发病机理有非常重要的意义[1,7]。在目前进行的IR研究中，尤其在研究某些药物对机体胰岛素敏感性的影响时，常常需要使用IR细胞模型。国外从九十年代初即开始这方面研究，并已经复制成功数种IR细胞模型。这些细胞模型主要分三类，即高胰岛素诱导培养模型，高类固醇培养模型和高葡萄糖培养模型。其中，高胰岛素培养模型最为稳定、可靠，使用也最为广泛[4,5]。

IR最主要的特征是胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用障碍，因此利用³H－D－葡萄糖掺入实验检测细胞的葡萄糖掺入率，可以较准确地评价细胞的胰岛素敏感性，从而判断是否存在IR[5]。本研究结果显示，运用高胰岛素诱导培养法，可使原代大鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 原代大鼠肝细胞和HepG2肝癌细胞的^{3}H－D－葡萄糖掺入率

	原代鼠肝细胞		HepG2肝癌细胞	
	高胰岛素细胞	对照细胞	高胰岛素细胞	对照细胞
实验次数	10	10	8	8
胰岛素浓度				
0 ng/ml	10.2±0.7	10.6±0.9	19.9±0.5	10.7±0.7
1 ng/ml	13.8±0.7＊＊bb	15.9±0.5aa	10.2±0.4＊＊	12.3±0.8
10 ng/ml	15.2±0.9＊＊bb	22.7±0.7aa	13.0±0.6＊＊	19.4±0.6
50 ng/ml	18.5±1.3＊＊bb	28.2±1.4aa	15.4±1.0＊＊	24.7±1.1
100 ng/ml	21.5±1.2＊＊bb	32.5±1.9aa	18.3±0.8＊＊	26.9±0.9
200 ng/ml	23.9±1.7＊＊bb	34.2±1.5aa	20.6±1.2＊＊	28.9±1.3

注：＊$P<0.05$，＊＊$P<0.01$，与相应的对照细胞比较。

a $P<0.05$，aa $P<0.01$，与HepG2肝癌细胞对照细胞比较。

b $P<0.05$，bb $P<0.01$，与HepG2肝癌细胞的高胰岛素细胞比较。

表中各数据的单位为nmol葡萄糖，mg蛋白质$^{-1}$，小时$^{-1}$

肝细胞和HepG2肝癌细胞的胰岛素刺激的葡萄糖掺入率显著下降，即胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用发生障碍，也就是发生IR。此外，本研究使用的^{3}H－D－葡萄糖掺入实验的批间、批内变异系数均低于文献报道[2]，葡萄糖掺入率数据接近文献报道[2]，提示本研究使用的^{3}H－D－葡萄糖掺入实验具有较高可靠性和稳定性。因此，本研究结果表明，运用高胰岛素诱导培养法可以复制出稳定、可靠的IR细胞模型。

目前使用较多的高胰岛素诱导培养IR细胞模型主要有两类，即原代大鼠肝细胞模型和肝肿瘤细胞模型[4,5]。由于肿瘤本身也存在着IR，因此有人认为肝肿瘤细胞模型的可靠性较差[8]。本研究也显示，HepG2肝癌细胞的基础葡萄糖掺入率、胰岛素刺激的葡萄糖掺入率以及胰岛素刺激后葡萄糖掺入率的增加幅度均显著低于原代大鼠肝细胞，提示HepG2肝癌细胞的胰岛素敏感性低于正常大鼠肝细胞，但这方面的研究尚需进一步深入。

参 考 文 献

1.Reaven GW. Diabetes, 1988;37:1595
2.Capeau J, et al. Endocrinology, 1982;111:993
3.石田香织.内科 1996;78:661
4.Han J, et al. J Cell Physiol, 1992;152:56
5.Melin B, et al. Metabolism, 1990;39:1089
6.Knowles BB, et al. Science, 1980;209:497
7.Foster DW. N Engl J Med, 1989;320:733
8.川上正舒，早日邦康.内科 1996;78:709

(收稿日期 1997－12－23)

Establishment and Identification of insulin－resistant cell model induced with insulin

Li Chenzhong, et al
Department of internal medicine, college of clinical medicine

Abstract This paper describes the method of establishment of insulin－resistant primary rat hepatocyte model and HepG2 human hepatocellular carcinoma cell model induced with high concentration of insulin. It can decrease the insulin－stimulated glucose uptake and metabolism of the rat hepatocytes and HepG2 cells, and caused them to be insulin resistant. The method is simple, practicable and reliable which can be widely used for the studies of insulin resistance

KEY WORDS Insulin resistance; Cell model; Hepatocyte