

· 基础研究 ·

高糖对小鼠胰岛和胰岛β细胞株 INS-1E 的长期作用

张艳玲^{1*}, 邹本良²

(中国中医科学院西苑医院: ¹ 教育处, ² 内分泌科, 北京 100091)

【摘要】目的 探讨高糖对胰岛β细胞 INS-1E 和小鼠胰岛的慢性作用。**方法** 雌性 NMRI 小鼠, 6~10 周龄, 苯巴比妥腹腔注射麻醉, 应用胶原酶技术消化胰腺分离胰岛。传代培养的 INS-1E 细胞和分离的小鼠胰岛分别于含 11.1, 25.0mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 培养液中培养 72 h, 然后于含 3.3, 16.7mmol/L 葡萄糖的 Krebs-Ringer 缓冲液中培养 60min, 留取上清液行胰岛素测定。INS-1E 细胞在含不同浓度的葡萄糖的 RPMI 1640 培养液中培养 72 h, 提取其总 RNA, 合成相应的 cDNA, 再行 RT-PCR 检测胰十二指肠同源异形盒-1(Pdx1), 胰岛素 1(Ins1), 胰岛素 2(Ins2) 和葡萄糖转运子 2(Glut2) 的基因表达。**结果** 高糖培养后 INS-1E 细胞和小鼠胰岛的基础 INS 分泌增加[INS-1E 细胞: (10.47 ± 0.78) vs (7.71 ± 0.59) ng/10000 细胞, $P < 0.01$; 小鼠胰岛: (3.85 ± 0.26) vs (2.18 ± 0.21) μg/L, $P < 0.001$], 糖刺激的 INS 分泌减少[INS-1E 细胞: (17.11 ± 1.98) vs (30.76 ± 2.20) ng/10000 细胞, $P < 0.001$; 小鼠胰岛: (14.78 ± 1.03) vs (20.46 ± 1.49) μg/L, $P < 0.01$]; 高糖处理后 INS-1E 细胞的 Pdx1, Ins1, Ins2 和 Glut2 的 mRNA 水平下降。**结论** 高糖对胰岛 β 细胞具有慢性毒性作用。

【关键词】 葡萄糖; 胰岛素分泌细胞; INS-1E 细胞

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00055

Chronic effects of high glucose concentration on function of isolated mouse islets and islet β cell line INS-1E

ZHANG Yanling, ZOU Benliang

(Department of Education, Department of Endocrinology, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese medicine, Beijing 100091, China)

【Abstract】 Objective To explore the chronic effects of excess glucose on INS-1E cells and isolated mouse islets. **Methods** Islets were isolated by the collagenase digestion from adult female NMRI mice (6-10 weeks) after induction of anesthesia by phenobarbital. INS-1E cells and isolated mouse islets were cultured in RPMI 1640 supplemented with 11.1 or 25.0mmol/L glucose for 72 h, respectively. Then the medium were changed to Krebs-Ringer buffer containing 3.3 or 16.7mmol/L glucose and incubated for 1 h. Correspondingly upper medium was collected for insulin assay. Total RNA was extracted from INS-1E cells after 72 h incubation with different concentration of glucose, then cDNA was synthesized and mRNA expressions of Pdx1, insulin 1, insulin 2, and GLUT2 were determined by RT-PCR. **Results** After incubation with excess glucose, basal insulin secretion was increased in both INS-1E cells and isolated mouse islets [INS-1E cells: (10.47 ± 0.78) vs (7.71 ± 0.59) ng/10000 cells, $P < 0.01$; isolated mouse islets: (3.85 ± 0.26) vs (2.18 ± 0.21) μg/L, $P < 0.001$], and glucose-stimulated insulin secretion was impaired [INS-1E cells: (17.11 ± 1.98) vs (30.76 ± 2.20) ng/10000 cells, $P < 0.001$; isolated mouse islets: (14.78 ± 1.03) vs (20.46 ± 1.49) μg/L, $P < 0.01$]. Pdx1, insulin 1, insulin 2, and GLUT2 mRNA levels were reduced in INS-1E cells after treatment of excess glucose. **Conclusion** Long-term exposure to supraphysiologic glucose concentrations may cause dysfunction of pancreatic islet cells.

【Key words】 glucose; insulin-secreting cells; INS-1E cell line

胰岛β细胞分泌胰岛素 (insulin, INS) 减少和 INS 抵抗是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2D) 的主要发病机制。研究发现, 糖耐量减退的患者和 T2D 患者的早期即呈现特征性胰岛 β 细胞功能不全^[1]。T2D 是一种进行性进展性疾病, 研究发现, 波动性

或持续性高血糖可能对胰岛 β 细胞造成持续性损害, 导致 β 细胞功能不全进行性加重, 但尚无一致性结论。本研究应用小鼠胰岛和克隆的 β 细胞株 INS-1E 细胞, 探讨了过多葡萄糖可能对胰岛 β 细胞的慢性毒性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄糖、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、牛血清白蛋白、N-2-羟乙哌嗪-N-2-乙烷磺酸(HEPES)、RPMI 1640 均购自 Sigma 公司;自行配制 Krebs-Ringer 缓冲液(主要成分为 115mmol/L 氯化钠、4.7mmol/L 氯化钾、1.28mmol/L 氯化钙、5.0mmol/L 碳酸氢钠、25mmol/L HEPES, pH 7.4), INS-1E 细胞由 C.B.Wollheim 教授(瑞士)馈赠。

1.2 细胞培养

INS-1E 细胞的培养液为改良的 RPMI1640(含有 10%胎牛血清, 11.1mmol/L 葡萄糖, 10mmol/L HEPES, 100 IU/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 0.5%牛血清白蛋白), 细胞在颈瓶中贴壁生长, 每周传代 1 次。

1.3 INS-1E 细胞释放胰岛素

应用胰酶消化, 培养液稀释, 离心收集 INS-1E 细胞, 种植在 24 孔板中, 每孔 1 ml, 2.5×10^6 /孔, 37℃、5%CO₂ 培养 1 d, 然后分别于 11.1, 25.0mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 中培养 72 h。经不同浓度葡萄糖处理后, INS-1E 细胞在 Krebs-Ringer 缓冲液预培养 15min; 而后每孔中加入含 3.3 或者 16.7mmol/L 葡萄糖的 Krebs-Ringer 缓冲液 1 ml 培养 1 h, 每孔留取 200 μl 上清液 - 20℃保存待测。

1.4 INS-1E 细胞计数

移出每孔中剩余的培养液, 加入蒸馏水 1 ml, 于 FLUOstar Galaxy 细胞计数仪上进行本底测定, 然后加入 20 μl SYTO24 试剂(SYTO24 溶于 0.01mmol/L 二甲基亚砜中), 37℃培养箱放置 45 min 后对细胞核进行染色, 再次于 FLUOstar Galaxy 细胞计数仪上进行细胞数测定。以细胞数来校正 INS 水平。

1.5 INS-1E 细胞的基因表达

INS-1E 细胞分别于含 11.1, 25.0mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 中培养 72 h, 应用 RNeasymini 试剂盒(Qiagen 公司, 德国), 提取 INS-1E 细胞总 RNA。应用 iScript™ cDNA 合成试剂盒(Bio-Rad 公司, 美国)进行逆转录反应(reverse transcription, RT), 每 20 μl RT 体系中加入 1 μg 总 RNA。在 ABI 7500 快速多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪上进行 RT-PCR 反应。相关基因的探针和引物为: 胰十二指肠同源异形盒-1(pancreas-duodenum homeobox-1, Pdx1, Rn00755591_m1), 胰岛素 1(insulin 1, Ins1, Rn02121433_g1), 胰岛素 2(insulin

2, Ins2, Rn01774648_g1), 葡萄糖转运子 2(glucose transporter type 2, Glut2, Rn00563565_m1), 均购自美国应用生物系统公司。RT-PCR 的反应体系如下: 5 μl 2 × TaqMan Universal Master 混合液, 0.5 μl 20 × TaqMan 探针, 与 50 ng 总 RNA 相当的 cDNA 水溶液。热循环如下: 95℃ 20 s, 95℃ 40 循环(每个循环 3 s), 60℃ 30 s。以真核细胞 18s 核糖体 RNA 为管家基因, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算基因的相对表达^[2]。

1.6 小鼠胰岛的分离和培养

雌性 NMRI 小鼠购自丹麦 Bomholtgaard 饲养研究中心, 饲以标准颗粒饲料和瓶装自来水。实验时, 苯巴比妥腹腔注射麻醉, 腹腔正中切口, 胰脏管道注入 3 ml 冰浴的 Hanks 平衡盐溶液(0.3 mg 胶原酶 P/ml), 取出胰腺, 37℃水浴箱中温浴 19 min 后, 用冰浴的 Hanks 平衡盐溶液洗涤 3 次, 体视显微镜下挑选胰岛, 迅速转移到含 RPMI1640 的培养皿中, 37℃培养箱(5%CO₂, 95%空气)过夜培养。第二天小鼠胰岛分别转移到含 11.1, 25.0mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 培养液中培养 72 h。

1.7 小鼠胰岛释放胰岛素

小鼠胰岛经上述处理后, 在加有 0.1%牛血清白蛋白, 3.3mmol/L 葡萄糖的 10 ml Krebs-Ringer 缓冲液中, 37℃水浴箱预培养 15 min。然后单个胰岛分别小心地置入 100 μl 含 3.3 或 16.7mmol/L 葡萄糖的 Krebs-Ringer 缓冲液中, 37℃培养 1 h, 从每孔胰岛中吸取 50 μl 上清液, - 20℃保存待测。

1.9 胰岛素的测定

应用大鼠 INS(Novo Nordisk, 丹麦)作为标准, 单¹²⁵碘标记的人 INS(Novo Nordisk A/S, 丹麦)作为示踪剂, 应用豚鼠抗猪 INS 抗体(Novo Nordisk A/S, 丹麦)进行放射免疫测定 INS, 应用乙醇分离自由的和结合的放射活性, 批内变异系数 5%, 批间变异系数 10%。

1.10 统计学处理

应用 GraphPad Prism 4.03 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用非配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对 INS-1E 细胞分泌 INS 的影响

高浓度葡萄糖处理后, INS-1E 细胞的基础 INS 分泌增加, 葡萄糖刺激的 INS-1E 细胞的 INS 分泌反应下降(表 1)。

表 1 高糖处理后 INS-1E 细胞分泌 INS 的变化

Table 1 Insulin secretion of INS-1E cells exposed to higher concentration of glucose ($n=18$, ng/10000 cells, $\bar{x} \pm s$)

组别	基础胰岛素	高糖刺激后的胰岛素
11.1 mmol/L 葡萄糖组	7.71 $\pm$ 0.59	30.76 $\pm$ 2.20
25.0 mmol/L 葡萄糖组	10.47 $\pm$ 0.78**	17.11 $\pm$ 1.98***

注: 与 11.1 mmol/L 葡萄糖组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 高糖对小鼠胰岛分泌 INS 的影响

高浓度葡萄糖处理后, 小鼠胰岛的基础 INS 分泌增加, 葡萄糖刺激的小鼠胰岛分泌 INS 的反应下降 (表 2)。

2.3 高糖培养后 INS-1E 细胞基因表达的改变

如图 1 所示, 高糖处理后, INS-1E 细胞 Pdx1, Ins1, Ins2, Glut2 的 mRNA 水平较对照组明显下降。

表 2 高糖处理后小鼠胰岛分泌 INS 的变化

Table 2 Insulin secretion of mouse islets exposed to higher concentration of glucose ($n=18$, ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	基础胰岛素	高糖刺激后的胰岛素
11.1 mmol/L 葡萄糖组	2.18 $\pm$ 0.21	20.46 $\pm$ 1.49
25.0 mmol/L 葡萄糖组	3.85 $\pm$ 0.26***	14.78 $\pm$ 1.03**

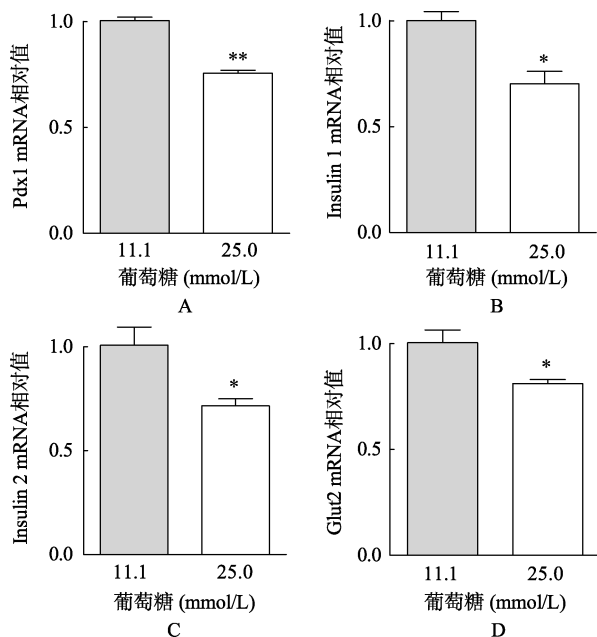
注: 与 11.1 mmol/L 葡萄糖组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 

图 1 高浓度葡萄糖培养对 INS-1E 细胞 Pdx1, Ins1, Ins2, Glut2 mRNA 水平的影响

Figure 1 Effect of higher glucose concentration on Pdx1, Ins1, Ins2, Glut2 mRNA in INS-1E cells

A: Pdx1; B: Ins1; C: Ins2; D: Glut2. 与 11.1 mmol/L 葡萄糖组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

T2D 起病和进行性发展的根本原因是胰岛 β 细胞功能的进行性减退^[1], T2D 前期和 T2D 患者的高血糖和高血脂被认为是胰岛 β 细胞功能减退的重要

原因, 但尚未得出一致结论。本研究应用克隆的胰岛 β 细胞株和分离的小鼠胰岛证实, 慢性高血糖可以引起胰岛 β 细胞功能减退, 即 β 细胞的基础 INS 分泌增加, 葡萄糖刺激的 INS 分泌减退。本研究显示, 慢性过多葡萄糖通过下调促 INS 转录的转录因子 Pdx1 的表达, 减少了 INS 基因的转录和表达, 进而导致葡萄糖刺激的 INS 分泌下降。

高糖培养后葡萄糖刺激的 INS 分泌减退不仅发生在 INS-1E 细胞, Robertson 等^[3]最早在高糖的条件下培养克隆的 β 细胞株 HIT-T15, 发现高糖培养数代后, HIT-T15 细胞的 INS 含量和 INS mRNA 水平明显下降, 其葡萄糖刺激的 INS 分泌下降; 而改用低浓度葡萄糖培养后其 INS 含量和 mRNA 水平得以部分恢复。而 Brock 等^[4]应用克隆的 β 细胞株 INS-1 细胞, 在高糖环境下培养 4 d, 其 INS mRNA 水平较对照组减少 90%, 并且高糖和低糖每天交替培养亦不能阻止 mRNA 水平的下降, 同时 INS-1 细胞也显示了葡萄糖刺激的 INS 分泌的下降。El-Assaad 等^[5]应用 β 细胞株 INS832/13, 证实单纯高脂培养, 其葡萄糖刺激的 INS 分泌无变化, 高糖培养后其葡萄糖刺激的 INS 分泌下降, 而高糖联合高脂培养后其葡萄糖刺激的 INS 分泌下降更明显。本组研究证实, 高糖培养后小鼠胰岛的葡萄糖刺激的 INS 分泌减退, 而 Khaldi 等^[6]发现, 大鼠胰岛在高糖环境下培养 1 周, 胰岛 β 细胞的基础 INS 分泌增加, 葡萄糖刺激的 INS 分泌下降。Harmon 等^[7]应用 ZDF 糖尿病大鼠 (Zucker diabetic fatty rat, ZDF) 观察慢性高血糖在体内对胰岛 β 细胞的作用, 发现 6 周龄尚未成模大鼠的胰岛 INS mRNA 水平较对照组代偿性增加, 而 15~16 周龄成模 ZDF 大鼠胰岛的 INS mRNA 和 Pdx1 mRNA 水平较对照组大鼠明显下降, 其胰岛的葡萄糖刺激的 INS 分泌较对照组大鼠下降。尤其重要的是, 从 T2D 患者分离的胰岛也具有葡萄糖刺激的 INS 分泌减退的特征^[8]。这些不同来源的 β 细胞都表现出高糖所致的相同的 β 细胞功能异常特征。

进一步的研究发现, 慢性高血糖引致多元醇通路、己糖途径、糖基化通路、蛋白激酶 C 同分异构体的激活等异常增加, 反应性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的形成增加, 过多的 ROS 使 Pdx1 的表达下降^[9], 而且 Pdx1 蛋白和 INS 基因启动子的结合能力减退^[7,9]。Pdx1 是强力刺激 INS 基因转录的转录因子, 本研究、Robertson 等^[3]、Brock 等^[4]和 Harmon 等^[7]的研究均证实, 慢性高糖导致克隆的 β

细胞和 ZDF 大鼠胰岛的 INS mRNA 表达水平下降。而且本研究表明, 慢性高糖使 Glut2 mRNA 表达下降也是 β 细胞的葡萄糖刺激的 INS 分泌减退的一种可能原因, 因为 Glut2 位于 β 细胞膜, 促进葡萄糖转运入 β 细胞, 是葡萄糖刺激 INS 分泌的必须环节。Lombardi 等^[10]的研究则证实, 高糖培养后, INS-1E 细胞发生内质网应激, 导致 Pdx1, Ins1, Glut2 mRNA 水平下降, 结果 INS-1E 细胞的葡萄糖刺激的 INS 分泌减退。

综上所述, 长期过多葡萄糖可能通过下调 Pdx1 和 Glut2 的表达, 影响 INS mRNA 的表达和葡萄糖在 β 细胞内的代谢, 导致胰岛 β 细胞功能减退, 这可能是 T2D 发病和进行性发展的重要原因。

4 致谢

感谢丹麦奥胡斯大学医院 Per Bendix Jeppesen 的技术指导。

【参考文献】

- [1] Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, *et al.* Predominant role of reduced beta-cell sensitivity to glucose over insulin resistance in impaired glucose tolerance[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(9): 1211-1219.
- [2] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [3] Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, *et al.* Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations[J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(2): 320-325.
- [4] Brock B, Mogensen JH, Gregersen S, *et al.* Glucose desensitization in INS-1 cells: evidence of impaired function caused by glucose metabolite(s) rather than by the glucose molecule per se[J]. *Metabolism*, 2002, 51(6): 671-677.
- [5] El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, *et al.* Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3061-3073.
- [6] Khaldi MZ, Guiot Y, Gilon P, *et al.* Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(2): E207-217.
- [7] Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, *et al.* *In vivo* prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression[J]. *Diabetes*, 1999, 48(10): 1995-2000.
- [8] Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, *et al.* Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected *in vitro* by a new reactive oxygen species scavenger[J]. *Diabetes Metab*, 2007, 33(5): 340-345.
- [9] Robertson R, Zhou H, Zhang T, *et al.* Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2007, 48(2-3): 139-146.
- [10] Lombardi A, Ulianich L, Treglia AS, *et al.* Increased hexosamine biosynthetic pathway flux dedifferentiates INS-1E cells and murine islets by an extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2-mediated signal transmission pathway[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 141-153.

(编辑: 任开环)