

• 基础研究 •

L-谷氨酰胺对克隆的胰岛 β 细胞株 INS-1E 细胞和 小鼠胰岛的急性刺激作用

刘振平 申晶 菅小红

【摘要】 目的 探讨 L-谷氨酰胺对 INS-1E 细胞和小鼠胰岛分泌胰岛素的作用。方法 INS-1E 细胞经传代培养 2 d 后,在 Krebs-Ringer 缓冲液中 37℃ 培养箱预培养 30 min,再用含有不同浓度葡萄糖和不同浓度 L-谷氨酰胺的改良 Krebs-Ringer 缓冲液培养 60 min,然后留取上清液进行胰岛素测定。雌性 NMRI 小鼠,6~10 周龄,苯巴比妥腹腔麻醉,应用胶原酶技术消化胰腺分离胰岛,置于 RPMI1640 培养皿中在 37℃ 培养箱(5%CO₂,95%空气)过夜培养。次日在 Krebs-Ringer 缓冲液中 37℃ 水浴培养箱预培养 30 min,然后分别把单个胰岛小心放入 100 μ l 含有不同浓度葡萄糖和不同浓度 L-谷氨酰胺的改良 Krebs-Ringer 缓冲液 37℃ 水浴培养箱培养 60min,然后留取 50 μ l 上清液进行胰岛素测定。结果 L-谷氨酰胺在 0.1~5mmol/L 范围不增加葡萄糖刺激的 INS-1E 细胞的胰岛素分泌,仅 10~20mmol/L 的 L-谷氨酰胺促进葡萄糖诱导的胰岛素分泌。L-谷氨酰胺在 0.1~10mmol/L 范围不促进葡萄糖诱导的小鼠胰岛的胰岛素分泌,仅 20mmol/L 的 L-谷氨酰胺促进葡萄糖诱导的胰岛素分泌。结论 大剂量 L-谷氨酰胺能增加葡萄糖诱导的 INS-1E 细胞和小鼠胰岛分泌胰岛素。

【关键词】 谷氨酰胺;胰岛;胰岛素

Acute stimulating effect of L-glutamine on INS-1E cell of the clonal β cell strain and mouse islets

LIU Zhenping, SHEN Jing, JIAN Xiaohong

Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital,
Beijing 100091, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of L-glutamine on the insulin secretion of INS-1E cells and mouse islets. Methods After passage of INS-1E cells incubated in the RPMI 1640 for 2 d, the cells were incubated in the Krebs-Ringer buffer (KRB) with 0.1% BSA for 30 min. After preincubation, the cells were incubated for 60 min in the modified KRB containing glucose and glutamine according to the protocol. After incubation, the medium was collected for insulin assay. Female NMRI mice were anaesthetized with pentobarbital. The collagenase technique was used to isolate pancreatic islets. The islets were hand picked under a stereomicroscope and kept in modified RPMI 1640 culture medium overnight at 37℃ and an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂. Then the islets were incubated in the KRB with 0.1% BSA for 30 min at 37℃. After preincubation, every islet was individually incubated at 37℃ for 60 min in the modified KRB 100 μ l containing glucose and glutamine according to the protocol. After incubation the medium was collected for insulin assay. Results L-glutamine at concentrations of 0.1-5mmol/L did not potentiate the glucose-induced insulin secretion of INS-1E cells, while L-glutamine potentiated glucose-induced insulin secretion at 10-20mmol/L. L-glutamine at concentrations of 0.1-10mmol/L did not potentiate the glucose (16.7 mmol/L)-induced insulin secretion of mouse islets, while L-glutamine at 20mmol/L could promote the glucose-induced insulin secretion. Conclusion Large doses of L-glutamine can enhance glucose-induced insulin secretion of INS-1E cells and mouse islets.

【Key words】 glutamine; islet cell; insulin

收稿日期:2007-05-15

作者单位:100091 北京市,解放军总医院第二附属医院内分泌科

作者简介:刘振平,男,1965年9月生,山东平原人,医学硕士,副主任医师。Tel:010-66775070, E-mail:lgjhjr@sina.com.cn

1 型糖尿病和 2 型糖尿病患者的主要临床表现之一是消瘦,是因为胰岛素(insulin)相对或绝对缺乏,三大物质碳水化合物、脂肪、蛋白质分解代谢增加,糖、氨基酸严重丢失。控制差的糖尿病患者存在

着严重的高糖血症、高脂血症和高氨基酸血症。高糖、高脂对胰岛 β 细胞的毒性作用已得到广泛的研究和认识,而对高氨基酸血症的研究甚少。L-谷氨酰胺可以由多种细胞和组织释放(例如骨骼肌和肝脏),血液中L-谷氨酰胺的浓度是有关细胞组织合成、释放和消耗之间的平衡体现。依细胞不同,细胞内L-谷氨酰胺浓度在2~20mmol/L之间,细胞外浓度平均是0.7mmol/L。甚至在基础状态下,胰岛也存在很高的蛋白质合成率,需要L-谷氨酰胺合成嘌呤和嘧啶,进而合成mRNA,最后合成蛋白质^[1]。近年研究发现,大鼠胰岛和BRIN-BD11细胞均快速消耗L-谷氨酰胺^[2]。不仅如此,多项研究提示,L-谷氨酰胺及其代谢产物参与胰岛 β 细胞分泌胰岛素的调节^[1],但研究结论不一。现就L-谷氨酰胺对克隆 β 细胞株INS-1E细胞和小鼠胰岛的急性刺激作用作一探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂 葡萄糖、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、牛血清白蛋白、HEPES、L-谷氨酰胺、RPMI1640均购自Sigma公司。

1.2 细胞培养 INS-1E细胞由CBWollheim教授(日内瓦,瑞士)馈赠。INS-1E细胞在潮湿的环境下生长,37℃培养箱(5%CO₂,95%空气)培养,培养液是改良的RPMI1640,加有10%(V/V)胎牛血清,11.1mmol/L的葡萄糖,10mmol/L的HEPES,100kU/L的青霉素,100mg/L的链霉素,0.5%牛血清白蛋白;在细颈瓶中细胞贴壁生长,每周传代一次。

1.3 INS-1E细胞释放胰岛素 应用胰酶消化,培养液稀释,然后离心收集INS-1E细胞,种植在24孔板中,每孔1ml,密度为 2.5×10^5 /L;37℃培养箱(5%CO₂,95%空气)培养2d后细胞贴壁,移出培养液,小心地加入Krebs-Ringer缓冲液1ml(mmol/L:氯化钠115,氯化钾4.7,氯化钙1.28,碳酸氢钠5.0,HEPES25)另外加有0.1%牛血清白蛋白,用2mol/L氢氧化钠调pH至7.4。37℃培养箱预培养30min,移出缓冲

液;每个孔中小心加入不同浓度的葡萄糖和L-谷氨酰胺缓冲液1ml(表1,2)。37℃培养箱培养1h,从每孔小心吸取300 μ l上清液,1000r/min离心2min,留取200 μ l上清液,-20℃保存待测。移出每孔中剩余的反应液,加入0.1mol/L氢氧化钠1ml放置30min溶解细胞,然后充分混匀收集1ml溶液,-20℃保存待测蛋白质。

1.4 小鼠胰岛的分离和培养 雌性NMRI小鼠,6~10周龄,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。用苯巴比妥腹腔麻醉小鼠后,应用胶原酶消化技术分离胰岛^[3],在体视显微镜下挑出胰岛,迅速转移到加有10%胎牛血清(V/V),青霉素G(100kU/L)和链霉素(100mg/L)的RPMI1640培养皿中在37℃培养箱(5%CO₂,95%空气)过夜培养。

1.5 小鼠胰岛释放胰岛素 小鼠胰岛在37℃培养箱(5%CO₂,95%空气)过夜培养后,移出培养液,小心地加入Krebs-Ringer缓冲液10ml,另加有0.1%牛血清白蛋白,3.3mmol/L葡萄糖;37℃水浴箱预培养30min。然后单个胰岛分别小心地置入100 μ l含不同浓度葡萄糖和L-谷氨酰胺的缓冲液(表3,4)中;37℃水浴箱培养1h,从每孔胰岛中小心吸取50 μ l培养上清液,-20℃保存待测。

1.6 胰岛素的测定 应用放射免疫的方法测定胰岛素,应用豚鼠抗猪的胰岛素抗体,用单¹²⁵I标记的人胰岛素作为示踪剂,大鼠的胰岛素(Novo Nordisk, Bagsvaerd, 丹麦)作标准。批内变异系数1.8%,批间变异系数3.6%。

1.7 蛋白质的测定 应用Lorry的方法测定蛋白质。

1.8 统计学方法 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

如表1,2所示,在16.7mmol/L葡萄糖的情况下,L-谷氨酰胺在0.1~5mmol/L范围内,INS-1E

表1 L-谷氨酰胺联合葡萄糖刺激INS-1E细胞分泌胰岛素与单纯葡萄糖作用(1.27 $\pm$ 0.10mg/g)的比较

谷氨酰胺+葡萄糖(mmol/L)	孔数	胰岛素/蛋白质(mg/g)	t 值	P 值
0.1+16.7	18	1.37 $\pm$ 0.09	0.7569	0.4543
0.25+16.7	18	1.35 $\pm$ 0.09	0.5972	0.5543
1.0+16.7	18	1.45 $\pm$ 0.11	1.246	0.2212
5.0+16.7	18	1.45 $\pm$ 0.13	1.097	0.2802
10+16.7	18	1.66 $\pm$ 0.12	2.415	0.0213
20+16.7	18	1.78 $\pm$ 0.12	3.161	0.0033

表 2 不同浓度葡萄糖对 INS-1E 细胞分泌胰岛素的刺激作用

葡萄糖 (mmol/L)	例数	胰岛素/蛋白质 (mg/g)	t 值	P 值
3.3	18	0.39±0.05		
16.7	18	1.27±0.10	7.639	<0.0001

表 3 不同浓度葡萄糖对小鼠胰岛分泌胰岛素的刺激作用

葡萄糖 (mmol/L)	例数	胰岛素/蛋白质 (μg/L)	t 值	P 值
3.3	16	0.87±0.10		
16.7	16	17.92±3.23	5.274	<0.0001

细胞分泌胰岛素的量无显著增加,仅 10~20mmol/L L-谷氨酰胺诱导的胰岛素释放显著高于单纯 16.7mmol/L 葡萄糖诱发的胰岛素释放,差异有显著的统计学意义。在无谷氨酰胺存在的情况下,16.7mmol/L 葡萄糖诱发的 INS-1E 细胞分泌胰岛素,显著高于 3.3mmol/L 葡萄糖诱发的胰岛素释放,差异有显著的统计学意义。

如表 3、4 所示,在 16.7mmol/L 葡萄糖的情况下,L-谷氨酰胺在 0.1~10mmol/L 范围内,小鼠胰岛分泌胰岛素的量无显著增加,仅 20mmol/L L-谷氨酰胺诱导的胰岛素释放显著高于单纯 16.7 mmol/L 葡萄糖诱发的胰岛素释放,差异有显著的统计学意义。在无 L-谷氨酰胺存在的情况下,16.7 mmol/L 葡萄糖诱导的小鼠胰岛胰岛素释放,显著高于 3.3mmol/L 葡萄糖诱导的胰岛素释放,差异有极显著的统计学意义。

3 讨论

氨基酸是一类重要的营养物质,很多研究提示胰岛 β 细胞表达多种氨基酸转运系统,并且摄取多种氨基酸,氨基酸通过以下 3 种机制刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素,即阳离子氨基酸的摄取直接导致胞浆膜去极化,部分氨基酸代谢产生 ATP,结果 ATP/

ADP 比值增加,ATP 敏感的 K⁺ 通道(K⁺_{ATP})关闭,与钠离子共同转运的氨基酸导致胞浆膜的去极化,电压依赖的钙通道开放,Ca²⁺ 内流,触发胰岛素胞吐作用^[3]。研究显示,10 mmol/L L-谷氨酰胺在 1.1mmol/L 葡萄糖存在的情况下很微弱地刺激 BRIN-BD11 细胞分泌胰岛素^[4]。本研究显示在 16.7mmol/L 葡萄糖存在的情况下,0.1~5mmol/L L-谷氨酰胺对葡萄糖诱导的 INS-1E 细胞分泌胰岛素无促进作用,仅 10~20 mmol/L 的 L-谷氨酰胺促进葡萄糖诱导的 INS-1E 细胞分泌胰岛素。与克隆的 INS-1E 细胞的结果相一致,在 16.7mmol/L 葡萄糖存在的情况下,0.1~10mmol/L L-谷氨酰胺对葡萄糖诱导的小鼠胰岛分泌胰岛素无促进作用,仅 20 mmol/L 的 L-谷氨酰胺促进葡萄糖诱导的小鼠胰岛分泌胰岛素。INS-1E 细胞是从 X 射线照射诱导的大鼠胰岛素瘤细胞移种而来,对生理范围葡萄糖反应良好,生长较容易,可培养生长数月并保持较好的反应性,是研究氨基酸对 β 细胞直接影响的一种有效手段。而且从本研究发现,INS-1E 细胞比小鼠胰岛对葡萄糖和 L-谷氨酰胺的刺激更敏感。

L-谷氨酰胺刺激胰岛素分泌的作用很弱有以下解释:(1)最主要的是 L-谷氨酰胺在胰岛 β 细胞经谷氨酰胺酶快速地代谢为谷氨酸,后者经谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)代谢为 α-酮戊二酸,参与到三羧酸循环的代谢中,经氧化磷酸化使细胞内 ATP 产生增加,结果 ATP/ADP 比值升高,胞膜 K⁺_{ATP} 通道关闭,胞浆膜去极化,Ca²⁺ 内流,促进胰岛素分泌。GTP 是 GDH 的变构抑制剂,L-亮氨酸是变构激活剂。研究证实 L-亮氨酸作为 GDH 的变构激活剂增加 L-谷氨酰胺刺激的胰岛素分泌。并且在过度表达 GDH 的胰岛,L-谷氨酰胺既增加线粒体的代谢也增加胰岛素的分泌^[5]。另有

表 4 不同浓度 L-谷氨酰胺联合葡萄糖刺激小鼠胰岛分泌胰岛素与单纯 16.7mmol/L 葡萄糖作用(17.92±3.23)的比较

葡萄糖+谷氨酰胺(mmol/L)	例数	胰岛素/蛋白质(μg/L)	t 值	P 值
16.7 + 0.1	16	16.45±3.04	0.3309	0.743
16.7 + 0.25	16	22.40±2.91	1.029	0.3117
16.7 + 1.0	16	22.95±3.80	1.008	0.3213
16.7 + 5.0	16	23.24±3.25	1.161	0.2548
16.7 + 10.0	16	29.20±5.92	1.672	0.105
16.7 + 20.0	15	37.93±5.42	3.220	0.0032

临床研究也证实 GDH 在 L-谷氨酰胺刺激胰岛素分泌中的重要作用。蛋白餐后发生低血糖的患者是因为 β 细胞对 L-亮氨酸敏感性增加,研究证实这类患者 GDH 的抑制性变构调节位点突变, GTP 的抑制性变构调节丧失^[6]。(2)很多研究认为 L-谷氨酰胺在 β 细胞内代谢为 L-谷氨酸,后者是增强葡萄糖诱导的胰岛素分泌通路的关键信使^[7]。据报道在葡萄糖刺激中,人、小鼠、大鼠胰岛和克隆的 β 细胞株的细胞内谷氨酸浓度增加,推测 L-谷氨酸被转运入分泌颗粒,促进 Ca^{2+} 依赖的胞吐分泌。而且在过度表达谷氨酸脱羧酶的克隆 β 细胞中, L-谷氨酸含量下降,高糖诱导的胰岛素分泌反应下降^[8]。但也有报告在葡萄糖刺激中, β 细胞内 L-谷氨酸含量无变化^[9]。(3)最近提出 L-谷氨酰胺在胰岛素分泌中起信使作用,研究发现在胰岛培养液中加入谷氨酰胺合成酶抑制剂,则葡萄糖诱导的胰岛素释放消失,而加入 L-谷氨酰胺或其类似物则胰岛对葡萄糖的分泌反应恢复。有待更多的研究证实^[11]。(4) L-谷氨酰胺在 β 细胞内进入谷氨酰循环产生谷胱甘肽,后者增加胰岛 β 细胞的生存能力和胰岛素分泌^[10]。据报道 L-谷氨酰胺在胰岛优先代谢为 γ 氨基丁酸和 L-天冬氨酸,在此情况下,没有 L-谷氨酰胺经三羧酸循环氧化,并依此解释单独 L-谷氨酰胺不能刺激胰岛素分泌^[12]。

综上所述,胰岛 β 细胞快速摄取、消耗 L-谷氨酰胺, L-谷氨酰胺在胰岛内可以代谢为 γ 氨基丁酸、L-天冬氨酸或 L-谷氨酸或进入谷氨酰循环。通常剂量的 L-谷氨酰胺无促进葡萄糖诱导的胰岛素分泌的急性作用,仅大剂量 L-谷氨酰胺 (10 ~ 20 mmol/L) 显示了刺激 β 细胞分泌胰岛素的急性作用。但尚需进一步研究 L-谷氨酰胺对胰岛 β 细胞的长期慢性作用。

参考文献

- [1] Bender K, Brennan L, Newsholme P. Amino acid metabolism, cell function, and diabetes. *Diabetes*, 2006, 55(Suppl 2):s39-s47.
- [2] Dixon G, Nolan J, McClenaghan NH, et al. A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11—the functional significance of L-alanine. *J Endocrinol*, 2003, 179:447-454.
- [3] Chen J, Jeppesen PB, Abudula R, et al. Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or beta-cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide; studies *in vitro*. *Life Sci*, 2006, 78:1748-1753.
- [4] McClenaghan NH, Barnett CR, O'Hare FP, et al. Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-response BRIN-BD11 pancreatic β cell line. *J Endocrinol*, 1996, 151: 349-357.
- [5] Carobbio S, Ishihara H, Fernandez-Pascual S, et al. Insulin secretion profiles are modified by overexpression of glutamate dehydrogenase in pancreatic islets. *Diabetologia*, 2004, 47: 266-276.
- [6] Hsu BY, Kelly A, Thornton PS, et al. Protein-sensitive and fasting hypoglycemia in children with the hyperinsulinism/hyperammonemia. *J Pediatr*, 2001, 138: 383-389.
- [7] Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*, 1999, 402: 685-689.
- [8] Rubi B, Ishihara H, Hegardt FG, et al. GAD65-mediated glutamate decarboxylation reduces glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36391-36396.
- [9] MacDonald MJ, Fahien LA. Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem*, 2000, 275: 34025-34027.
- [10] Avila J, Barbaro B, Gangemi A, et al. Intra-ductal glutamine administration reduces oxidative injury during human pancreatic islet isolation. *Am J Transplant*, 2005, 5: 2830-2837.
- [11] Li C, Buettger C, Kwagh J, et al. A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem*, 2004, 279: 13393-13401.
- [12] Fernandez-Pascual S, Mukala-Nsengu-Tshibangu A, Martin DRR, et al. Conversion into GABA (gamma-aminobutyric acid) may reduce the capacity of L-glutamine as an insulin secretagogue. *Biochem J*, 2004, 379: 721-729.