

· 实验研究 ·

甲状旁腺素相关肽对 INS-1 细胞株胰岛素分泌的影响*

梁华晟¹, 薛耀明², 钟宇华¹

(1. 广西医科大学第九附属医院内分泌科, 广西北海 536000;

2. 南方医科大学南方医院内分泌科, 广东广州 510515)

摘要:目的 探讨甲状旁腺素相关肽(PTHrP)对大鼠胰岛β细胞瘤株 INS-1 胰岛素含量的影响。方法 根据不同干预条件分为空白对照组、PTHrP 干预组(分别应用 1、10、100 pmol/L 的 PTHrP 干预), 48 h 后应用放射免疫法检测各组葡萄糖刺激胰岛素分泌作用, Fura-3/AM 荧光负荷技术测定 Ca²⁺。Western Blot 检测细胞胰岛素及胰腺-十二指肠同源框 1(PDX-1)的表达。结果 PTHrP 对 INS-1 细胞葡萄糖刺激胰岛素分泌能力及 Ca²⁺ 负荷呈浓度依赖性关系。PTHrP 组上调胰岛素及 PDX-1 表达, 与空白对照组比较差异有统计学意义(P<0.01)。结论 PTHrP 可以促进胰岛β细胞胰岛素分泌及合成。

关键词:甲状旁腺素相关肽; 胰岛素; INS-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.014

中图分类号: R365.587

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2732-02

PTHrP induced insulin secretion and production in INS-1*

LIANG Hua-sheng¹, XUE Yao-ming², ZHONG Yu-hua¹

(1. Department of Endocrine Secretion, the Ninth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Department of Endocrine Secretion, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou, 510515, China)

Abstract: Objective To study whether the PTHrP had increased insulin secretion and production in INS-1. **Methods** Based on different condition, there are two groups had been divided: control group, PTHrP group(1, 10, 100 pmol/L PTHrP), which glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was detected by Radioimmunoassay, the expression of insulin and PDX-1 were detected by Western Blot after 48 h. Fura-3/AM was used to measure the fluorescent intensity of Ca²⁺. **Results** The GSIS and fluorescent intensity of Ca²⁺ in response to PTHrP in a dose dependent manner, the expression of insulin and PDX-1 in PTHrP group was higher than control group. **Conclusion** PTHrP can increase insulin secretion and production in INS-1.

Key words: PTHrP; insulin; INS-1

甲状旁腺素相关肽(PTHrP)属于体内广泛分布的一种促生长细胞因子。有研究表明, 转 PTHrP 基因大鼠常常并发低血糖, 研究者认为主要是胰岛β细胞增殖后, 所导致的胰岛素分泌升高^[1], 然而, 还有研究发现糖尿病患者中 PTHrP 含量与血糖浓度呈正相关^[2]。由此可能引出以下疑问: 在排除了胰岛β细胞增殖所引起的胰岛素含量增高外, 高糖状态下 PTHrP 水平升高, 对胰岛β细胞胰岛素分泌是否直接具有何种的作用。因此, 本实验将 PTHrP 作用于大鼠胰岛细胞瘤株 INS-1, 观察不同浓度的 PTHrP 作用后对胰岛素含量、钙浓度及调控胰岛素合成胰腺-十二指肠同源框 1(PDX-1)表达, 以便探讨 PTHrP 对胰岛细胞胰岛素合成及分泌的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与试剂 大鼠胰岛细胞瘤株 INS-1 购自上海细胞库, PTHrP 购于美国 Sigma 公司, 胎牛血清(FCS)购自天津正江高科技公司, PDX-1 及胰岛素抗体均购于美国 Santa Cruz 公司, 胰岛素放免分析试剂盒购自中国原子能科学研究院。

1.2 细胞培养 常规培养于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 每周传代 2~3 次。

1.3 实验分组与处理 取对数生长期 INS-1, 按每孔约 3×

10⁴ 个接种于 6 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 吸去原有 RPMI-1640 培养液, 换为 10% FCS 培养液, 培养 24 h 使所有细胞的生长同步化。按下列分组进行处理: (1) 空白对照组; (2) PTHrP 干预组: 分别应用 1、10、100 pmol/L 的 PTHrP 干预; 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 2 d, 每孔细胞均为每 24 小时换液 1 次。

1.4 葡萄糖刺激胰岛素分泌(GSIS)能力(高糖/基础 GSIS)测定 以每孔 10⁵ 个接种于 12 孔板, 5 h 后移去原有培养液, 用 Hank's(hank's balanced salt solution, HBSS)液清洗细胞 2 次, 每次 30 min。以不同葡萄糖浓度(2.8 mmol/L、16.7 mmol/L)的 HBSS 液孵育细胞 1 h, 使用 ACS180 型全自动化学发光免疫分析系统检测其中胰岛素含量, 分别作为基础和 高糖刺激下胰岛素释放, 计算高糖/基础 GSIS 作为 GSIS 能力, 结果以胰岛细胞总蛋白校正。

1.5 激光共聚焦显微镜检测细胞内游离 Ca²⁺ INS-1 细胞在 DMEM 中(含 10% FBS), 37℃、50 mL/L CO₂ 培养 2~3 d 后, 用 HBSS 液清洗 2 次, 加入终浓度为 10 μmol/L 的 Fura-3/AM, 37℃ 负载 40 min, 染色结束后再用 HBSS 缓冲液洗涤 2 次, 置于激光扫描共聚焦显微镜下观察, 激发波长为

* 基金项目: 广西科技厅自然科学基金资助项目(桂科自 NO. 0991294); 广西北海市科学研究与技术开发计划资助项目(北科合字 200901059)。

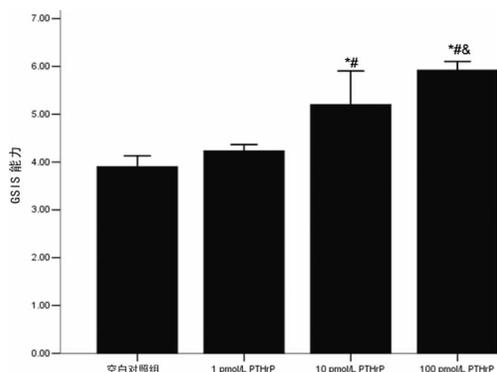
488 nm, 每个处理组选取大约 30 个细胞, 记录平均荧光强度, 以此来衡量 INS-1 细胞内 Ca^{2+} 的水平。

1.6 Western Blot 检测胰岛素及 PDX-1 表达 进行常规细胞裂解获取蛋白后, 与预染蛋白 marker 一起上样, 经分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 完毕后将蛋白质电转印到 PVDF 膜上, 将膜放入含 100 g/L 脱脂奶粉的 TBST 中封闭, 4 °C 过夜, 然后与一抗(鼠抗胰岛素、PDX-1)按 1 : 500、1 : 300 比例室温孵育 90 min, 用 TBST 液洗膜 3 次, 每次 5 min, PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1 : 1 000)室温孵育 45 min 后, 用 TBST 液洗膜 3 次, 每次 5 min。用 ECL 显色试剂盒显示目的条带。

1.7 统计学方法 所有试验均重复 3 次以上, 采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行处理, 采用 *t* 检验比较组间差异。

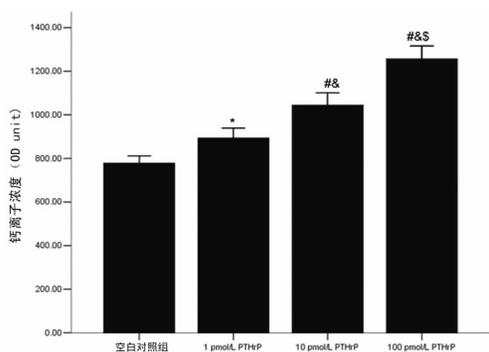
2 结 果

2.1 INS-1 细胞 GSIS 能力检测 同样取 48 h 作用后检测各组细胞 GSIS 能力(图 1)。1 pmol/L PTHrP 处理的 INS-1 与空白对照组 GSIS 能力比较差异无统计学意义, 但 10 pmol/L 及 100 pmol/L 的 PTHrP 干预细胞 48 h 后, 细胞 GSIS 能力高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中以 100 pmol/L PTHrP 作用能力最高。提示 PTHrP 可能呈浓度依赖性的提高 INS-1 细胞 GSIS 能力。



与空白对照组比较, * : $P < 0.01$; 与 1 pmol/L PTHrP 干预组比较, # : $P < 0.01$; 与 10 pmol/L PTHrP 干预组比较, & : $P < 0.05$ 。

图 1 各组细胞 GSIS 能力检测



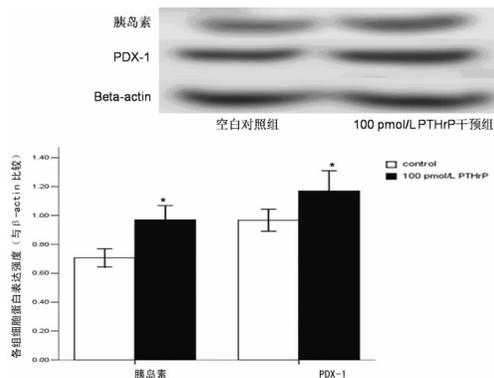
与空白对照组比较, * : $P < 0.05$, # : $P < 0.01$; 与 1 pmol/L PTHrP 干预组比较, & : $P < 0.01$; 与 10 pmol/L PTHrP 干预组比较, & : $P < 0.05$ 。

图 2 各组细胞中 Ca^{2+} 浓度检测

2.2 各组 INS-1 细胞内 Ca^{2+} 浓度 经 PTHrP 处理的各组细胞 Ca^{2+} 浓度均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 1pmol/L、10pmol/L、100pmol/L 的 PTHrP 干预的各组细胞

Ca^{2+} 浓度差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 PTHrP 可能具有浓度依赖性促进 INS-1 细胞 Ca^{2+} 内流(图 2)。

2.3 INS-1 细胞胰岛素及 PDX-1 表达检测 根据上述结果提示, 取 48 h 及 100 pmol/L PTHrP 干预观察点进行各组细胞 Western Blot 检测胰岛素及 PDX-1 表达(图 3), 提示 100 pmol/L PTHrP 干预组中胰岛素及 PDX-1 表达显著高于空白对照组 ($P < 0.01$)。



与空白对照组比较, * : $P < 0.01$ 。

图 3 胰岛素、PDX-1 在各组细胞中的表达

3 讨 论

目前认为 PTHrP 是一种细胞自分泌及旁分泌同时作用的一类细胞因子, 它们在 Ca^{2+} 通路平衡和细胞新陈代谢过程中发挥重要作用。既往研究发现, 在胰岛 β 细胞中均存在 PTHrP 及其受体的表达, 其中 PTHrP 受体可能是 β 细胞感受器, 其激活对 β 细胞增殖及分化具有促进作用^[3]。本研究提示, PTHrP 具有浓度依赖性地促进 INS-1 细胞对葡萄糖刺激反应作用, 其分泌胰岛素功能显著增强, 与 1993 年 Ishida 等^[4] 研究结果相似: 胰岛 β 细胞内 PTHrP 含量与胰岛素分泌显著相关, 而 Ishida 还应用共聚焦定位提示胰岛 β 细胞内胰岛素与 PTHrP 共同分布, 由此可以推论 PTHrP 能显著提高 β 细胞胰岛素含量。

本研究还发现 PTHrP 促 INS-1 细胞胰岛素分泌同时细胞内钙浓度升高。目前认为 PTHrP 是调节钙磷代谢的主要激素, PTHrP 与活化甲状旁腺素受体 1 结合可以促进细胞钙内流^[5-6], 而 β 细胞中胰岛素分泌也主要依赖于钙通路的开放, 由此可见, PTHrP 可能是通过调节钙通路的活性而影响 β 细胞胰岛素的分泌。 β 细胞中胰岛素含量升高, 除上述提示的分泌增多外, 还需排除胰岛素合成增多的因素, 为此, 本研究进行胰岛素合成的相关调控因子检测以阐明该机制, 结果显示 PTHrP 干预后, 能显著诱导细胞内胰岛素及 PDX-1 表达升高, 而既往研究证实 PDX-1 激活是 β 细胞胰岛素合成重要调控因子, PDX-1 能与胰岛素基因启动子结合, 启动胰岛素基因转录的活性, 促进胰岛素合成^[3]。故此认为 PTHrP 可能同时具有促进 β 细胞胰岛素合成作用。

综上所述, PTHrP 不仅能促进胰岛 β 细胞增殖分化, 同时还能显著促进 β 细胞中胰岛素分泌及合成, 特别针对 2 型糖尿病患者的特点, 不但同时存在胰岛素分泌及胰岛素合成的缺陷, 也常常合并胰岛细胞凋亡导致胰岛功能衰竭^[7]。从病因上讲, PTHrP 具有的优势可促使 PTHrP 更有望成为糖尿病治疗药物之一。

过程中发挥重要的作用。而 CCND1 过表达与某些肿瘤的组织类型相关,其功能主要是促进细胞增殖,是 G₁ 期细胞增殖信号的关键蛋白质,被视为癌基因,其过度表达可致细胞增殖失控而恶性化,但是它在不同肿瘤中阳性检出率不同,与组织分化程度相关,在分化差的肿瘤中表达增强。CDK 则是一类重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包括 CDK1~7 种,主要生物学作用是启动 DNA 的复制和诱发细胞的有丝分裂^[7-8],以复合物形式出现,在 G₁ 早期,CCND 表达并与 CDK2 或 CDK4 结合,成为始动细胞周期的启动子^[9-12],1.0 μmol/L 浓度的 TSA 对 EC9706 细胞有明显的生长抑制作用,并呈现一定的量效关系。本研究发现 TSA 在 1.0 μmol/L 浓度之上可明显诱导食管癌细胞 EC9706 细胞周期阻滞,可明显增强 EC9706 细胞中 p21、p27 等基因的表达,明显降低 CCND1、CDK4D 等基因的表达,但是否 TSA 抑制 EC9706 细胞的生长还与其它基因表达的改变相关,具体的机制有待继续研究探讨。

参考文献:

- [1] Tian FQ, Chen XS, Xie J, et al. Effect of Trichostatin A on expression of HDAC1 in K562 cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16(11): 1642.
- [2] And M, Hansen R, Ding RX, et al. Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 1943.
- [3] Seoj S, Chon Y, Kim R, et al. Cell cycle arrest and lytic induction of EBV-transformed B lymphoblastoid cells by a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A[J]. Oncol Rep, 2008, 19(1): 93.
- [4] 张梅芳. 原发性肝细胞癌组织中 p53 和 p21 WAF/CIP1 及 MDM2 蛋白的表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤防治

杂志, 2007, 14(15): 1121.

- [5] Radhakrishnan SK, Feficiano CS, Najmabadi F, et al. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle[J]. Oncogene, 2004, 23(23): 4173.
- [6] 王振国, 郭和清. 膀胱癌 Ha-ras 基因突变、p21 蛋白表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(8): 59.
- [7] Kalpana S, Joshi. In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(3): 918.
- [8] Yu Q, Sicinska E, Geng Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2006, 9(1): 23.
- [9] Henkens T, Papeleu P, Elaut G, et al. Trichostatin A, a critical factor in maintaining the functional differentiation of primary cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 218(1): 64.
- [10] Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, et al. Integrin V and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder[J]. Cancer Urology, 2002, 60: 531.
- [11] Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy[J]. Cancer Res, 2002, 2: 3812.
- [12] Kitazono M, Goldsmith ME, Aikou T, et al. Enhanced adenovirus transgene in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228 [J]. Cancer Res, 2001, 61: 6328.

(收稿日期: 2010-02-04 修回日期: 2010-03-04)

(上接第 2733 页)

参考文献:

- [1] Vasavada RC, Wang L, Fujinaka Y, et al. Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation; an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis[J]. Diabetes, 2007, 56(11): 2732.
- [2] Legakis I, Mantouridis T. Positive correlation of PTH-related peptide with glucose in type 2 diabetes[J]. Exp Diabetes Res, 2009, 10(11): 855.
- [3] Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(4): 329.
- [4] Ishida H, Suzuki K, Someya Y, et al. Possible compensatory role of parathyroid hormone-related peptide on main-

tenance of calcium homeostasis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1993, 129(6): 519.

- [5] Lozano D, de Castro LF, Dapia S, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia[J]. Endocrinology, 2009, 150(5): 2027.
- [6] Legakis I. The role of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the pathophysiology of diabetes mellitus [J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(6): 717.
- [7] 黄荣曦, 卢松, 王成剑. 门冬胰岛素 30 联合阿卡波糖对初诊 2 型糖尿病胰岛功能的影响[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2273.

(收稿日期: 2010-02-20 修回日期: 2010-03-22)