

## Apelin 对葡萄糖的毒性作用及对胰岛细胞 PDX-1 表达的影响\*

黄炫赓,黎英荣<sup>△</sup>,郑晓菲,潘海林,苏宏业,夏宁,肖常青  
(广西医科大学第一附属医院内分泌代谢病科,南宁 530007)

**[摘要]** **目的** 探讨 Apelin 对葡萄糖毒性作用及对胰岛细胞胰十二指肠同源盒蛋白-1(PDX-1)表达的影响。**方法** 在不同葡萄糖浓度下(正糖组 5.6 mmol/L,高糖组 16.7 mmol/L,极高糖组 33.3 mmol/L),+/- Apelin-36 培养胰岛 β 细胞株 NIT-1 细胞 3 d,然后测定基础和葡萄糖刺激后胰岛细胞胰岛素分泌量,测定细胞内胰岛素含量和 PDX-1 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 与正糖组比较,高糖组和极高糖组的基础和葡萄糖刺激后胰岛素分泌、细胞内胰岛素均明显减少,PDX-1 蛋白表达下降( $P < 0.05$ );与未加 Apelin 组比较,加 Apelin 高糖组和极高糖组的基础和葡萄糖刺激后胰岛素分泌、细胞内胰岛素明显减少,PDX-1 蛋白表达下降( $P < 0.05$ );6 组胰岛细胞的胰岛素水平与 PDX-1 蛋白表达呈正相关,与 PDX-1 mRNA 表达无关。**结论** Apelin 可能通过降低 PDX-1 蛋白表达参与葡萄糖毒性作用,引起胰岛素分泌减少,从而在糖尿病的发病机制中发挥作用。

**[关键词]** Apelin;胰十二指肠同源盒蛋白-1;葡萄糖毒性

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)33-4633-03

## Effects of Apelin on glucose toxicity and islet cells PDX-1 expression\*

Huang Xuangeng, Li Yingrong<sup>△</sup>, Zheng Xiaofei, Pan Hailin, Su Hongye, Xia Ning, Xiao Changqing

(Department of Endocrinology and Metabolism Diseases, First Affiliated Hospital,

Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Apelin on glucose toxicity and islet cells PDX-1 protein expression. **Methods** The islet β cell line NIT-1 cells were incubated in the medium containing different glucose concentrations(normal glucose concentration group 5.6 mmol/L, high glucose concentration group 16.7 mmol/L, extremely high glucose concentration group 33.3 mmol/L) and +/- Apelin-36 respectively for 3 d. Then the basic insulin secretion amount of islet cells and their secretion amount after glucose stimulation were detected. The intracellular insulin content and the PDX-1 protein and mRNA expression were detected. **Results**

Compared with the normal glucose group, the basic insulin secretion, secretion after stimulation and intracellular insulin in the high glucose group and extremely high glucose group were significantly decreased and PDX-1 protein expression was declined( $P < 0.05$ ); compared with non-adding Apelin group, the basic insulin secretion, secretion after stimulation and intracellular insulin in the adding Apelin high glucose group and extremely high glucose group were significantly decreased and PDX-1 protein expression was decreased( $P < 0.05$ ); the insulin level in islet cells of 6 groups was positively correlated with PDX-1 protein expression and had no correlation with PDX-1 mRNA expression. **Conclusion** Apelin may participate in the glucose toxic effect by decreasing PDX-1 protein expression, causes the decrease of insulin secretion, thus plays a role in the pathogenesis of diabetes.

**[Key words]** Apelin; pancreatic duodenal homeobox-1; glucose toxicity

Apelin 是一种孤儿 G 蛋白耦联受体——血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白的天然配体,由 Tatamoto 等<sup>[1]</sup>使用反向药理学的方法从牛胃分泌物中提取得到。近年来 Apelin 成为糖尿病领域的新热点,多个研究发现糖尿病患者血 Apelin 升高<sup>[2-4]</sup>。Apelin 参与糖尿病的发病机制,与胰岛素抵抗关系密切<sup>[4-6]</sup>,但具体机制尚未阐明。本课题组的临床研究<sup>[7]</sup>发现肥胖引起血清 Apelin 升高,糖尿病可以导致肥胖患者的 Apelin 进一步升高。本课题组的动物实验<sup>[8]</sup>观察到 Apelin-36 静脉注射进入大鼠体内后可以降低大鼠高血糖时的胰岛素水平,提示 Apelin 可能与葡萄糖毒性作用有关。肖常青等<sup>[9]</sup>的研究发现高浓度葡萄糖通过降低胰十二指肠同源盒蛋白-1(pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1)的蛋白表达而抑制胰岛素的分泌,认为高浓度葡萄糖对 PDX-1 蛋白表达的抑制是葡萄糖毒性作用的机制之一。Apelin 是否通过抑制 PDX-1 蛋白表达,参与葡萄糖毒性机制而在糖尿病的发病中发挥作用呢?本课题组拟通过培养小鼠 NIT-1 细胞,将 Apelin-36 和不同浓度的葡萄糖加入培养液,检测基础和葡萄糖刺激的胰岛素释放、细胞内胰

岛素含量、PDX-1 蛋白及 mRNA 的表达,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 本试验选用胰岛 β 细胞株 NIT-1 细胞为试验对象,按培养液所含葡萄糖浓度的不同及是否加用 Apelin 分为 6 组:(1)未加 Apelin 正糖组(葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L);(2)加 Apelin 正糖组(葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L);(3)未加 Apelin 高糖组(葡萄糖浓度为 16.7 mmol/L);(4)加 Apelin 高糖组(葡萄糖浓度为 16.7 mmol/L);(5)未加 Apelin 极高糖组(葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L);(6)加 Apelin 极高糖组(葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L)。Apelin-36 和胰岛素酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 TSZ 公司, PDX-1 多克隆抗体、S-P 免疫组化试剂盒、PDX-1 原位杂交试剂盒购自上海诺渊生物科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 基础和葡萄糖刺激的胰岛素释放试验** 分别收集各组胰岛细胞至 1 mL 离心管(每管  $1 \times 10^6$  个细胞),分批预孵育于 HBSS 液,37 °C 孵育 60 min, PBS 洗涤 2 次后,在含 5.6 mmol/L

\* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅重点课题(桂卫重 2010024)。  
<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: liyingrong70@sina.com。

作者简介:黄炫赓(1980—),本科,主治医师,主要从事糖尿病及其并发症的研究工作。

L 葡萄糖的 HBSS 缓冲液中 37 °C 预孵育 1 h, 弃去缓冲液, 然后将细胞置于含 5.6 mmol/L 葡萄糖(基础)和 16.7 mmol/L 葡萄糖(葡萄糖刺激)的 HBSS 缓冲液 1 mL 中 37 °C 孵育 1 h, 收集反应液, 然后用 ELISA 法测定胰岛素含量。

**1.2.2 细胞内胰岛素含量测定** 收集各组培养的小鼠 NIT-1 细胞至 1 mL 离心管(每管  $1 \times 10^6$  个细胞), 进行反复的冷冻、溶解、破碎然后以酸化乙醇溶液进行抽提, 4 °C 孵育 16~24 h, 用 ELISA 法测定胰岛素含量。

**1.2.3 PDX-1 蛋白的表达** 收集各组 NIT-1 细胞进行涂片, 用 4% 的多聚甲醛溶液固定 20 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 按照 S/P 免疫组化试剂盒的说明书进行操作。在显微镜下计算各组细胞的阳性率。

**1.2.4 PDX-1 mRNA 的表达** 取各组新鲜的小鼠 NIT 细胞涂片, 用 4% 多聚甲醛/0.1% DEPC/0.1 mmol/L PBS (pH 7.2~7.6) 固定 20~30 min, 按照 PDX-1 原位杂交试剂盒的说明书进行操作, 在显微镜下计算各组细胞的阳性率。

**1.3 统计学处理** 运用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 计数资料用百分率表示, 采用  $\chi^2$  检验, 两变量相关性采用 Spearman 相关分析。检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组胰岛细胞基础和葡萄糖刺激后胰岛素分泌、细胞内胰岛素的比较** (1) 与正糖组比较, 高糖组和极高糖组的基础和葡萄糖刺激后胰岛素、细胞内胰岛素分泌均明显减少 ( $P<0.05$ ); (2) 与未加 Apelin 组相比, 加 Apelin 的高糖组和极高糖组的胰岛  $\beta$  细胞内胰岛素在基础和葡萄糖刺激后分泌明显下降 ( $P<0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组胰岛素分泌的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞内胰岛素	基础胰岛素	刺激后胰岛素
未加 Apelin 正糖组	112±5	64±3	132±6
加 Apelin 正糖组	108±4	61±2	130±4
未加 Apelin 高糖组	58±3*	43±3*	47±4*
加 Apelin 高糖组	35±1*▲	30±3*▲	33±3*▲
未加 Apelin 极高糖组	21±1*	34±3*	37±3*
加 Apelin 极高糖组	11±1*△	19±1*△	18±2*△

\*:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 正糖组相比; \*:  $P<0.05$ , 与加 Apelin 正糖组相比; ▲:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 高糖组相比; △:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 极高糖组相比。

**2.2 各组 PDX-1 蛋白及 PDX-1 mRNA 表达** (1) 与正糖组比较, 高糖组和极高糖组的 PDX-1 蛋白表达下降 ( $P<0.05$ ); (2) 与未加 Apelin 组相比, 加 Apelin 的高糖组和极高糖组的 PDX-1 蛋白表达明显下降 ( $P<0.05$ ); (3) 各组间 PDX-1 mRNA 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组 PDX-1 蛋白及 PDX-1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	PDX-1 蛋白	PDX-1 mRNA
未加 Apelin 正糖组	20.12±0.12	14.71±0.04
加 Apelin 正糖组	19.71±0.06	15.43±0.05
未加 Apelin 高糖组	11.01±0.08*	17.17±0.11
加 Apelin 高糖组	8.08±0.11*▲	16.92±0.08
未加 Apelin 极高糖组	5.17±0.04*	17.11±0.07
加 Apelin 极高糖组	3.15±0.02*△	17.87±0.05

\*:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 正糖组相比; \*:  $P<0.05$ , 与加 Apelin 正糖组相比; ▲:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 高糖组相比; △:  $P<0.05$ , 与未加 Apelin 极高糖组相比。

培养条件, 经 Spearman 分析发现: 胰岛  $\beta$  细胞的胰岛素分泌量及细胞内含量均与 PDX-1 蛋白水平呈显著正相关, 但与 PDX-1 mRNA 无相关性, 见表 3。

表 3 PDX-1 与胰岛素的相关分析

项目	基础胰岛素	刺激后胰岛素	细胞内胰岛素	PDX-1 蛋白	PDX-1 mRNA
PDX-1 蛋白	0.884△	0.898△	0.911△	1.000	0.205△
PDX-1 mRNA	0.152	0.295	0.469	0.205△	1.000

△:  $P<0.05$ 。

## 3 讨论

目前全世界糖尿病患病率越来越高<sup>[10-11]</sup>, 但糖尿病发病和进行性加重的原因远未阐明。张艳玲等<sup>[12]</sup>发现高糖对胰岛  $\beta$  细胞有慢性毒性作用。Lombardi 等<sup>[13]</sup>的研究则证实, 高糖培养后胰岛  $\beta$  细胞发生内质网应激, 导致 PDX-1、葡萄糖转运子-2 mRNA 水平下降, 结果胰岛  $\beta$  细胞的葡萄糖刺激的胰岛素分泌减退。Harmon 等<sup>[14]</sup>的动物实验发现 ZDF 糖尿病鼠长期高血糖可以显著抑制 PDX-1 基因及胰岛素基因的表达, 进而抑制与胰岛素基因启动子结合的 PDX-1 蛋白的表达, 引起胰岛素释放减少, 提示葡萄糖毒性作用的发生与长期高血糖所致的 PDX-1 蛋白表达下降有关。肖常青等<sup>[9]</sup>的研究结果也发现高浓度葡萄糖通过降低 PDX-1 的蛋白表达而抑制胰岛素的分泌。本研究发现: 胰岛  $\beta$  细胞的胰岛素分泌量及细胞内含量均与 PDX-1 蛋白水平呈显著正相关; 与正糖组比较, 高糖组和极高糖组的 PDX-1 蛋白表达均明显下降, 其基础和刺激后胰岛素分泌、细胞内胰岛素含量也明显减少。上述体内外试验均提示葡萄糖毒性作用的发生机制可能为: 高血糖降低 PDX-1 蛋白表达, 减少胰岛素的释放, 从而进一步加重高血糖, 引起恶性循环。

多项研究提示 Apelin 能抑制胰岛素的释放。Sörhede 等<sup>[15]</sup>观察到 Apelin-36 可以使肥胖 C57BL/6J 大鼠模型静脉葡萄糖耐量试验快速相(1~5 min)的胰岛素释放减低 35%。本课题组的研究<sup>[8]</sup>通过高脂饮食及 STZ 腹腔注射建立肥胖糖尿病大鼠的模型, 然后进行静脉葡萄糖耐量试验, 发现肥胖糖尿病大鼠注射 Apelin-36 后, 胰岛素曲线下面积减少 38.1%。上述动物实验提示 Apelin 在高糖的条件下可以抑制胰岛素的分泌, 进而参与葡萄糖毒性作用。本研究发现加 Apelin 的高糖组和极高糖组的基础和葡萄糖刺激后胰岛素分泌、细胞内胰岛素含量较未加 Apelin 组明显下降, 而在正糖组加与未加 Apelin 上述指标无明显差异, 证实 Apelin 在高糖条件下抑制胰岛素的分泌, 参与了葡萄糖毒性作用, 这与 Sörhede 等<sup>[15]</sup>的研究结果相似: Apelin 抑制葡萄糖浓度为 16.7 mmol/L 的胰岛素释放, 而葡萄糖浓度为 2.8 或 8.3 mmol/L 时, Apelin 对胰岛素释放无影响。综合上述动物实验及细胞学研究的结果, 说明 Apelin 在高糖条件下可以抑制胰岛素的释放, 可能参与葡萄糖毒性作用。

Apelin 参与葡萄糖毒性作用是否通过 PDX-1 的蛋白表达减低这一途径呢? 本课题研究结果为: 加 Apelin 的正糖组与未加 Apelin 正糖组相比, PDX-1 蛋白表达无明显差异, 血糖正常时 Apelin 对 PDX-1 蛋白表达无影响; 与未加 Apelin 组相比, 加 Apelin 的高糖组和极高糖组的 PDX-1 蛋白表达明显下降, 提示 Apelin 参与葡萄糖毒性作用可能通过 PDX-1 的蛋白表达减低这一途径。

综上所述, Apelin 可能通过降低 PDX-1 蛋白表达, 参与葡萄糖毒性作用, 引起胰岛素分泌减少, 对其进行更深入的研究将为揭示糖尿病的发病机制提供更多的依据。

## 参考文献

- [1] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2):471-476.
- [2] Habchi M, Duvillard L, Cottet V, et al. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2014, 81(5):696-701.
- [3] Alexiadou K, Kokkinos A, Liatis SA, et al. Differences in plasma apelin and visfatin levels between patients with type 1 diabetes mellitus and healthy subjects and response after acute hyperglycemia and insulin administration[J]. *Hormones*, 2012, 11(4):444-450.
- [4] 谭丽艳, 齐亚灵, 李洪源, 等. 初诊老年肥胖 2 型糖尿病患者血清 nesfatin-1 及 apelin 水平与胰岛素抵抗的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(8):2034-2035.
- [5] Zhu S, Sun F, Li W, et al. Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 353(1/2):305-313.
- [6] Yu S, Zhang Y, Li MZ, et al. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(19):3440-3444.
- [7] 黎英荣, 连连, 苏宏业, 等. 2 型糖尿病和肥胖患者血清 Apelin 与胰岛素抵抗的关系研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10):1322-1323.

- [8] 郑晓菲, 黎英荣, 陈伟, 等. Apelin 对肥胖糖尿病大鼠胰岛功能的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2014, 31(4):546-548.
- [9] 肖青青, 邓宏明, 黄媛. 高浓度葡萄糖对 PDX-1 表达和胰岛分泌功能的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2006, 14(4):281-283.
- [10] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(4):228-236.
- [11] Yang WY, Lu JM, Weng JP, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12):1090-1101.
- [12] 张艳玲, 邹本良. 高糖对小鼠胰岛和胰岛  $\beta$  细胞株 INS-IE 的长期作用[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2012, 11(3):222-225.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Sörhede Winzell M, Magnusson C, Åhrén B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice[J]. *Regul Pept*, 2005, 131(1/3):12-17.

(收稿日期:2016-02-23 修回日期:2016-06-11)

(上接第 4632 页)

再磨除中转后部骨质,能将电极插入鼓阶,但应小心,避免损伤中转起始部的前庭阶、蜗管以及毗邻的前庭和底转。通过观察发现徐钢<sup>[15]</sup>、徐金操<sup>[16]</sup>对 CI 植入点定位非常精准,能够确保 CI 的电极顺利植入。相信随着 HRCT 的普及和 MRI 水成像技术的成熟,以及颞骨精细解剖的不断深入研究,CI 植入点的选择针对耳蜗发育不良的患儿更加个案化、更具精准性,植入的成功率也将大幅上升。

## 参考文献

- [1] 李中华,王兴海.解剖学技术[M].北京:人民卫生出版社,1997:53-60.
- [2] 李晓兵,田建明,王培军,等.内耳结构多层螺旋 CT 容积漫游技术成像初探[J].*中华放射学杂志*,2002,36:461-462.
- [3] 孟庆玲,韩卉,庞刚,等.国人内耳门的应用解剖研究[J].*解剖与临床*,2003,8(1):7-9.
- [4] 霍伟康.内耳道区血管、神经及膜性结构的解剖及临床应用[D].广州:南方医科大学,2009:1-9.
- [5] 王冰,鲜军舫,牛延涛,等.健康成人内听道底 CT 及 MRI 解剖[J].*放射学实践*,2008,23(9):950-954.
- [6] Day JD, Kellogg JX, Fukushima T, et al. Microsurgical anatomy of the inner surface of the petrous bone: neuro-radiological and morphometric analysis as an adjunct to the retrosigmoid transmeatal approach [J]. *Neurosurgery*, 1994, 34(6):1003-1008.
- [7] 于海玲,张秋贵,于爱华.正常人内耳 MR 成像观察及解

- 剖测量[J].*青岛大学医学院学报*,2005,41(1):31-32,35.
- [8] 马辉.内耳的多层螺旋 CT 及影像后处理[D].武汉:华中科技大学,2005:30-35.
- [9] 李书玲,刘怀军,池琛,等.正常人内耳前庭、半规管及耳蜗的 MRI 测量[J].*中华放射学杂志*,2003,37(1):55-58.
- [10] 柏树令.系统解剖学[M].北京:人民卫生出版社,2010:288.
- [11] 柏树令.系统解剖学[M].北京:人民卫生出版社,2008:279-280.
- [12] 杨颖,夏明,边志强,等.高分辨 CT 正常内耳解剖结构的测量研究[J].*山东大学学报(医学版)*,2008,46(11):1075-1079.
- [13] 曹克利,魏朝刚.亟待加强儿童人工耳蜗植入术后效果的评估[J].*中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2010,45(10):798-799.
- [14] Lenarz T, Battmer RD, Lesinski A, et al. Nucleus double electrode array: a new approach for ossified cochleae[J]. *Am J Otol*, 1997, 18(6 Suppl):S39-41.
- [15] 徐钢,田湘娥,冯永,等.电子耳蜗植入术相关解剖标志及手术入路的探讨[J].*中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2002,8(3):177-179.
- [16] 徐金操,郭梦和,张宏征,等.人工耳蜗植入术相关结构的解剖测量[J].*听力学及言语疾病杂志*,2006,14(3):185-186,210.

(收稿日期:2016-03-27 修回日期:2016-05-11)