

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.08.004

胰岛素对大鼠胰岛 β 细胞 VGLUT2 基因表达的调控研究*王树文^{1,2}, 李涛¹, 林鸿程¹, 杨丰¹, 林荣文^{1△}, 陈远寿^{2▲}

(1. 广东医科大学第二临床医学院, 广东东莞 523808; 2. 遵义医学院生理教研室, 贵州遵义 563099)

[摘要] **目的** 探讨胰岛素对大鼠胰岛 β 细胞囊泡谷氨酸转运子 2(VGLUT2) 基因表达的调控及其作用机制。**方法** 以不同浓度胰岛素和不同的 siRNAs 处理大鼠胰岛 β 细胞系 RIN-5F, 采用 Real-time qPCR 和 Western blot 检测 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 胰岛素在浓度为 100、200 nmol/L 时对 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达抑制明显 ($P < 0.05$), 且在 100 nmol/L 浓度时抑制效果最明显。100 nmol/L 胰岛素处理后, 与 0 h 比较, VGLUT2 mRNA 和蛋白表达在 12、18、24 h 均受到明显抑制 ($P < 0.05$)。与 Blank 组、Lip2000 组及 Control-siRNA 组比较, 利用 IR-siRNA、IRS1-siRNA 和 IRS2-siRNA 分别干扰 RIN-5F 后, 各干扰组 VGLUT2 mRNA 及蛋白表达受 100 nmol/L 胰岛素的抑制情况均明显恢复 ($P < 0.05$)。**结论** 胰岛素在低浓度抑制大鼠胰岛 β 细胞 VGLUT2 基因表达。

[关键词] 糖尿病; 胰岛素; 囊泡谷氨酸转运蛋白质 2; 受体; 胰岛素; 胰岛素受体底物

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)08-1019-04

Study on insulin for regulating VGLUT2 gene expression in rat pancreatic β cell*WANG Shuwen^{1,2}, LI Tao¹, LIN Hongcheng¹, YANG Feng¹, LIN Rongwen^{1△}, CHEN Yuanshou^{2▲}

(1. The Second College of Clinical Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Teaching and Researching Section of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulation of insulin VGLUT2 gene expression in pancreatic β cells and its exactly mechanism. **Methods** The rat pancreatic β cell line RIN-5F was treated by different insulin concentrations and different siRNA. The changes of VGLUT2 mRNA and protein expression levels were detected by adopting real-time qPCR and Western blot. **Results** Insulin with a concentration of 100, 200 nmol/L significantly inhibited the expressions of VGLUT2 mRNA and protein in RIN-5F cells ($P < 0.05$), moreover the inhibiting effect was most significant at 100 nmol/L. After 100 nmol/L insulin treatment, the expressions of VGLUT2 mRNA and protein at 12, 18, 24 h were significantly inhibited compared with that at 0 h ($P < 0.05$). Compared with the Blank group, Lip2000 group and Control-siRNA group, after interfering RIN-5F by using IR-siRNA, IRS1-siRNA and IRS2-siRNA, the inhibition situation of VGLUT2 mRNA and protein expressions by 100 nmol/L insulin in each group was significantly recovered ($P < 0.05$). **Conclusion** Insulin at low concentration could inhibit VGLUT2 gene expression in rat pancreatic β cell line RIN-5F.

[Key words] diabetes mellitus; insulin; vesicular glutamate transport protein 2; receptor; insulin; insulin receptor substrate

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由多种病因引起的慢性非传染性疾病,其患病率呈逐年递增趋势,已对全球居民的健康造成严重影响^[1]。据国际糖尿病联盟(IDF)最新数据显示,2014年全球糖尿病估测患者达到 3.87 亿,其中 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占 90% 以上^[2]。随着 DM 死亡人数及医疗费用支出的不断增加,DM 疾病的负担已日趋严重。然而,DM 具体的发病机制至今仍未完全明确,这给临床诊治带来很大困难。因此,深入研究 DM 发病机制对预防 DM 及提高其治疗效果具有重要意义。据报道,T2DM 的发生、发展与胰岛素的分泌密切相关,囊泡谷氨酸转运子 2 (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2) 转运谷氨酸进入胰岛素分泌囊泡的过程是胰岛素分泌的限速步骤^[3-4]。由于胰岛素是临床上治疗 DM 的首选,所以对于胰岛素分泌机制的深入研究有利于对 DM 发病机制的理解。

本实验以大鼠胰岛 β 细胞 RIN-5F 作为研究对象,从胰岛

素对 VGLUT2 基因表达调控入手,通过 Real-time qPCR、Western blot、siRNA 干扰等方法,观察胰岛素对 VGLUT2 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响,阐明胰岛素信号通路中胰岛素受体(insulin receptor, IR)、胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)与 VGLUT2 表达之间的关系,以期为明确 DM 的发生机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 RIN-5F 由上海生科院细胞库提供。

1.1.2 试剂 羊抗鼠 VGLUT2 多克隆抗体(美国 Sigma 公司);胰岛素、胎牛血清(美国 Gibco 公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,一抗、二抗稀释液(碧云天生物科技公司);IgG-辣根过氧化物酶(HRP)、IR siRNA、IRS-1 siRNA、IRS-2 siRNA、siRNA Transfection Medium、Control siRNA、siRNA Transfection Reagent(广州锐博奥公司);Lipofectami-

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(31171351);广东医科大学大学生创新创业训练计划项目(2011ZZDS002);广东医科大学科研基金项目(M2013006)。作者简介:王树文(1982-),实验师,硕士,主要从事糖尿病发病机制研究。△ 通信作者, E-mail: 376254076@qq.com。

▲ 通信作者, E-mail: jcbshengli@163.com。

ne™2000(美国 Invitrogen 公司)。

1.1.3 仪器 7500 定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);成像仪、电泳槽(美国 Bio7Rad 公司);ND-1000 微量核酸蛋白检测仪(美国 Nanodrop 公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养 RIN-5F (1)RIN-5F 的复苏、培养、传代及冻存按照文献[5]报道方法操作。(2)细胞计数:吸取 10 μ L 细胞悬液滴于盖片与计数板间,静置,然后镜下计算细胞总数。细胞数/mL=4 大格细胞总数/4 \times 10⁴。

1.2.2 处理 RIN-5F (1)以 1 mmol/L 胰岛素为母液,配制不同浓度(0、50、100、200、500、1 000 nmol/L)胰岛素各 15 mL;(2)大鼠胰岛 β 细胞 RIN-5F 分装至 6 个培养皿及 1 个 6 孔板中;(3)用以上 6 种浓度胰岛素分别处理 RIN-5F 30 h。

1.2.3 实验分组及 RNA 干扰实验 首批分组为:空白组(Blank 组)、Lipofectamine™ 2000 组(Lip2000 组)、Control-siRNA 组、IR-siRNA 组。第 2 批分组为:Blank 组、Lip2000 组、Control-siRNA 组、IRS1-siRNA 组及 IRS2-siRNA 组。根据设计组别分装 RIN-5F 至相应的培养皿和 6 孔板中,然后用不同的 siRNAs 处理 RIN-5F。

1.2.4 蛋白质的提取 收取细胞(6 个培养皿),PBS 洗 1 遍,加入 RIPA 细胞裂液裂解,12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液即为 RIN-5F 的总蛋白样品,然后以 BCA 法测定蛋白质浓度。于样品中加入 5 \times 十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白上样缓冲液(V/V=4:1),水浴(100 $^{\circ}$ C)10 min 后立即置于冰中直至其完全冷却,最后按每孔 5 μ g 蛋白量上样。

1.2.5 总 RNA 的提取 按 Invitrogen 操作说明 Trizol 法提取样品总 RNA;RNA 用变性琼脂糖凝胶电泳检测完整性^[6]。吸取 1 μ L RNA 溶液样品,测定(用 NanoDrop 分光光度计)260 nm 及 280 nm 的吸光度(A)值,得到 RNA 浓度。RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值必须在 1.8~2.0。分装样品(以 20 μ L 为最小单位),保存(-86 $^{\circ}$ C,1 年内有效)。

1.2.6 VGLUT2 蛋白的测定 采用 Western blot 法,以 β -actin 为内参,洗膜结束立刻配制电化学发光(ECL)显影液,接着浸泡 PVDF 膜 5 min,然后曝光显影(用成像系统)得出图片,通过 BandScan 图像分析的软件来分析其光密度值,并计算出 VGLUT2 的相对含量。

1.2.7 PCR 引物设计 引物经 Shanghai biological engineering company 合成;VGLUT2 上游引物 5'-AGA AGG CTC CGC TAT GCG ACT G-3',下游引物 5'-ATC CTC CTG GAA TCT GGG TGA TG-3',扩增片断长度 351 bp;内参 β -actin 上游引物 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3',下游引物 5'-CTT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3',扩增片断长度 267 bp。

1.2.8 Real-time qPCR 每组 4 个样品 cDNA,每个重复进行 3 个平行实验,参照 Takara 的 One Step SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒说明书进行反应^[7]。通过 v 1.4 SDS 软件分析所得数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度胰岛素对 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达的影响

胰岛素浓度为 100、200 nmol/L 时 VGLUT2 mRNA 及蛋白表达均受到明显抑制($P < 0.05$),并且在 100 nmol/L 时所受抑制最明显,见图 1、2。

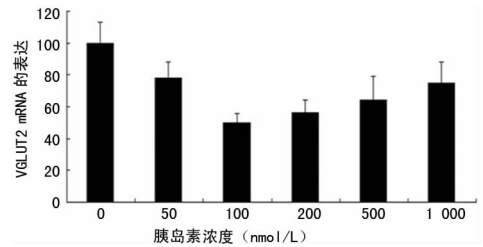


图 1 不同浓度胰岛素对 VGLUT2 mRNA 表达的影响

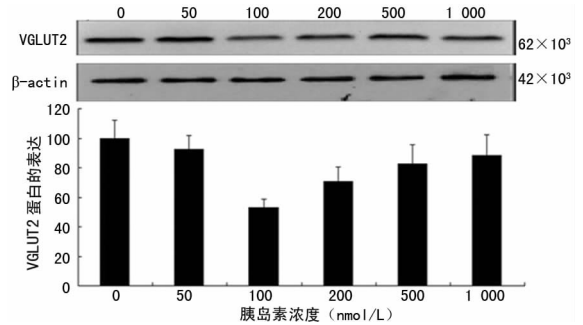


图 2 不同浓度胰岛素对 VGLUT2 蛋白表达的影响

2.2 100 nmol/L 胰岛素在不同时间点对 VGLUT2 的 mRNA 和蛋白表达的调节 与 0 h 比较, VGLUT2 mRNA 和蛋白表达在 12、18、24 h 均受到明显抑制($P < 0.05$),其中在 12 h 时 mRNA 表达受抑制最为明显,在 24 h 时蛋白表达受抑制最为明显,见图 3、4。

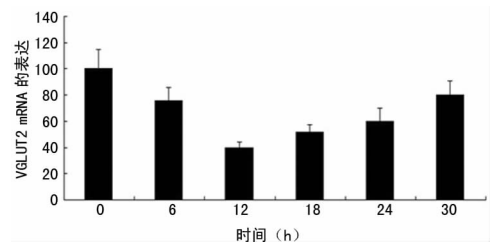


图 3 100 nmol/L 胰岛素在不同时间点对 VGLUT2 mRNA 表达的影响

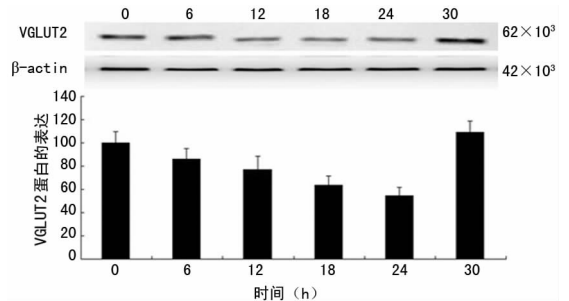


图 4 100 nmol/L 胰岛素在不同时间点对 VGLUT2 蛋白表达的影响

2.3 胰岛素信号通路的 IR 及 IRS 对 VGLUT2 表达的影响

2.3.1 IR-siRNA 干扰对 IR mRNA 表达的影响 与 Blank 组、Lip2000 组、Control-siRNA 组比较, IR-siRNA 组 IR mRNA 表达受到明显抑制($P < 0.05$),见图 5。

2.3.2 IRS1-siRNA 及 IRS2-siRNA 干扰对 IRS1、IRS2 mRNA

NA 表达的影响 IRS1-siRNA 组及 IRS2-siRNA 组与 Blank 组、Lip2000 组及 Control-siRNA 组比较,IRS1、IRS2 的 mRNA 表达均受到明显抑制($P<0.05$),见图 6。

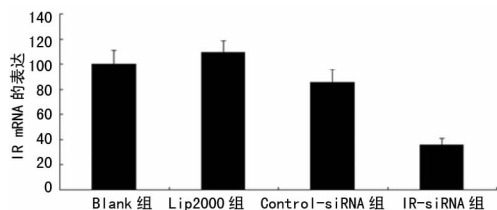


图 5 IR-siRNA 干扰对 RIN-5F 细胞的 IR mRNA 表达的影响

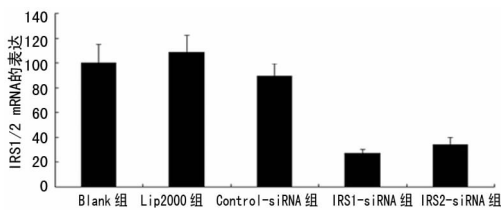


图 6 IRS1-siRNA 和 IRS2-siRNA 干扰对 IRS1 和 IRS2 mRNA 表达的影响

2.3.3 IR-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达的影响 与 Blank 组、Lip2000 组及 Control-siRNA 组比较,IR-siRNA 组 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达明显上调($P<0.05$),见图 7、8。

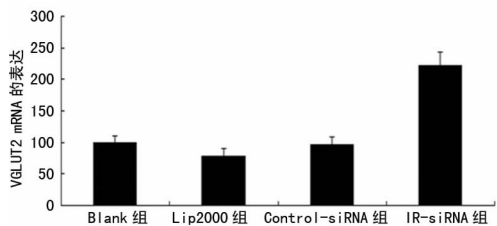


图 7 IR-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 mRNA 表达的影响

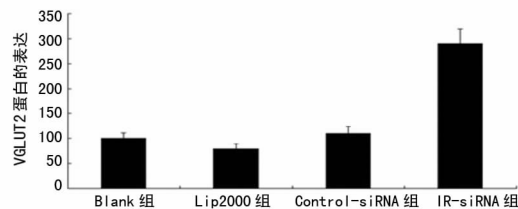
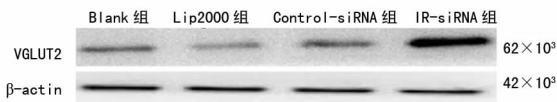


图 8 IR-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 蛋白表达的影响

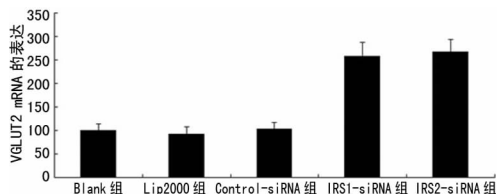


图 9 IRS1/IRS2-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 mRNA 表达的影响

2.3.4 IRS1/IRS2-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达的影响 与 Blank 组、Lip2000 组及 Control-siRNA 组比较,IRS1-siRNA 及 IRS2-siRNA 组 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达明显上调($P<0.05$),见图 9、10。

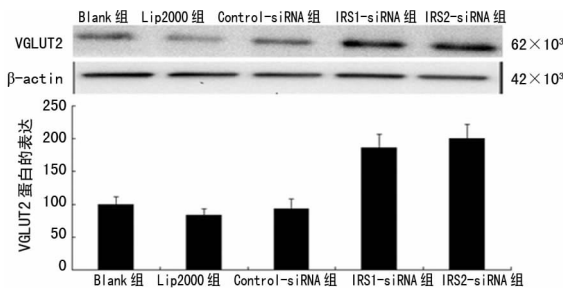


图 10 IRS1/IRS2-siRNA 干扰对 100 nmol/L 胰岛素抑制 VGLUT2 蛋白表达的影响

3 讨论

胰岛素抵抗和胰岛素代偿性分泌不足会导致 T2DM 的发生。明确胰岛素的分泌机制将有助于对 DM 病因的理解。在胰腺细胞分泌胰岛素的过程中,谷氨酸向分泌囊泡中的转运由 VGLUT2 完成,经过这种逆浓度梯度的转运造成的分泌囊泡内外的谷氨酸浓度差是驱动分泌囊泡向细胞膜运动的主要动力,这一步骤也是胰岛素分泌的限速步骤^[8]。VGLUT2 的基因表达受葡萄糖浓度的调控^[9],由于胰岛素是治疗 DM 的首选,那么这种外源的胰岛素对于患者胰岛功能的影响是什么,目前尚不清楚。

从本实验的结果可以得知,在无糖条件下,胰岛素在特定浓度和时间点均可明显下调 VGLUT2 mRNA 和蛋白表达,并且其最佳浓度为 100 nmol/L,最佳作用时间点为 12 h(mRNA 水平)和 24 h(蛋白质水平)。

利用 IR-siRNA、IRS1-siRNA 及 IRS2-siRNA 分别干扰 RIN-5F 后,100 nmol/L 胰岛素对 VGLUT2 基因表达的抑制明显下降。据此可以推断,在该过程中 IR、IRS1 及 IRS2 3 种参与因子发挥了重要作用。研究表明,胰岛素与 IR 结合后能够激活胰岛素信号通路,从而调控细胞的分化、增殖、生存及代谢^[10-11]。IRS 亦具有连接胰岛素信号通路中 IR 的功能,并且在胰岛素抵抗过程中起着举足轻重的作用^[12-13]。有报道显示,IRS1 和 IRS2 能够通过不同途径对胰岛素信号传导通路进行反馈调控进而影响胰岛素的分泌^[14]。另外,胰岛素信号通路受阻,则会造成胰岛 β 细胞功能损伤和外周胰岛素抵抗;但值得注意的是,在 T2DM 发病初期,胰腺尚能通过代偿功能刺激胰岛素产生和分泌的增加,维持血糖的稳定,患者此时并未出现 DM 的临床症状;随着病情的进一步发展,胰腺最终会丧失代偿功能而导致 T2DM 的发生^[15-18]。以上研究表明,在胰岛素信号通路中,VGLUT2 基因是通过 IR、IRS1、IRS2 这 3 种参与因子对胰岛素的分泌进行了反馈调控。

综上所述,本实验明确了胰岛素对 VGLUT2 基因表达进行反馈调控的信号通路及其信号通路中参与因子(IR、IRS1、IRS2)的功能,阐明了胰岛素、VGLUT2 基因及参与因子之间的关系,这将为 DM 发病机制的理论研究提供新的参考和为临床诊治 DM 提供新的思路。

参考文献

[1] PASALA S K,RAO A A,SRIDHAR G R. Built environ-

- ment and diabetes[J]. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 2010, 30(2):63-68.
- [2] 汪会琴, 胡如英, 武海滨, 等. 2 型糖尿病报告发病率研究进展[J]. *浙江预防医学*, 2016, 28(1):37-39.
- [3] TENGHOLM A, GYLFE E. Oscillatory control of insulin secretion[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 297(1/2):58-72.
- [4] 陈立强. 谷氨酸信号转导与胰岛素慢分泌调节机制研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(3):357-359.
- [5] 王伟福, 宁晓燕, 陈晓武, 等. 维生素 D3 对胰腺癌 PANC-1 细胞中 PTCH、Gli-1 基因表达及细胞增殖凋亡的影响[J]. *广东医学*, 2016, 37(6):815-819.
- [6] 梁敏, 王海峰, 王剑松, 等. 不同分级与分期膀胱癌微小核糖核酸 3658 和人源性长寿保障基因 II 型表达的变化[J]. *广东医学*, 2016, 37(14):2110-2114.
- [7] 田戈, 姜敏. Nrf2-ARE 信号通路在调节慢性阻塞性肺疾病氧化失衡过程中的作用机制[J]. *广东医学*, 2016, 37(12):1808-1810.
- [8] MAECHLER P, GJINOVCI A, WOLLHEIM C B. Implication of glutamate in the kinetics of insulin secretion in rat and mouse perfused pancreas[J]. *Diabetes*, 2002, 51(Suppl 1):S99-102.
- [9] LI T, BAI L, LI J, et al. Sp1 is required for glucose-induced transcriptional regulation of mouse vesicular glutamate transporter 2 gene[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7):1994-2003.
- [10] RUTTER G A. Insulin secretion: feed-forward control of insulin biosynthesis? [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(12):R443-445.
- [11] OHSUGI M, CRAS-MNEUR C, ZHOU Y, et al. Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (RIN-5F) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(6):4992-5003.
- [12] LEIBIGER I B, LEIBIGER B, BERGGREN P O. Insulin signaling in the pancreatic beta-cell[J]. *Annu Rev Nutr*, 2008, 28:233-251.
- [13] 唐辰义, 周后德. 胰岛素受体底物家族成员的结构和组织特异性与功能的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(3):295-302.
- [14] BRIAUD I, DICKSON L M, LINGOHR M K, et al. Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3):2282-2293.
- [15] TSUNEKAWA S, DEMOZAY D, BRIAUD I, et al. FoxO feedback control of basal IRS-2 expression in pancreatic beta cells is distinct from that in hepatocytes[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(1):S50.
- [16] DEMOZAY D, TSUNEKAWA S, BRIAUD I, et al. Specific glucose-induced control of insulin receptor substrate-2 expression is mediated via Ca²⁺-dependent calcineurin/NFAT signaling in primary pancreatic islet β -cells[J]. *Diabetes*, 2011, 60(11):2892-2902.
- [17] SIMON-SZABO L, KOKAS M, GREFF Z, et al. Novel compounds reducing IRS-1 serine phosphorylation for treatment of diabetes[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(2):424-428.
- [18] KANETO H. Pathophysiology of type2 diabetes mellitus [J]. *Nippon Rinsho*, 2015, 73(12):2003-2007.

(收稿日期:2017-10-11 修回日期:2017-12-21)

(上接第 1018 页)

- [9] 孙德彬, 熊雪芳, 周家峰, 等. 哮喘患者外周血调节性 T 细胞和 Th1/Th2 的变化及其与哮喘病情的关系[J]. *中国现代医生*, 2016, 54(16):6-9.
- [10] 高俊. Th1/Th2 及红细胞免疫指标在支气管哮喘患者中的变化[J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(5):630-632.
- [11] JI N F, XIE Y C, ZHANG M S, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1):76-81.
- [12] WEI W, YAN L, ZHE L, et al. The Th2 cell-promoting cytokines IL-33 and TSLP, but not IL-25, are potential biomarkers for endotypes of asthma[J]. *Chest*, 2016, 149(4):147-151.
- [13] MITCHELL P D, O'BYRNE P M. Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 169(23):104-112.
- [14] LI H T, CHEN Z G, LIU H, et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP[J]. *Exp Lung Res*, 2016, 42(6):322-333.
- [15] COOK E B, STAHL J L, SCHWANTES E A, et al. IL-3 and TNF α increase Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) expression on eosinophils and enhance TSLP-stimulated degranulation [J]. *Clin Mol Allergy*, 2012, 10(1):8.
- [16] 钱江, 吴健, 安弘, 等. Ag85B 调节小鼠髓样树突状细胞的成熟和 TSLP 介导下 TSLPR 和 OX40L 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 27(9):1680-1687.
- [17] KAUR D, BRIGHTLING C. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma[J]. *Chest*, 2012, 141(2):494-499.
- [18] 吴奎, 王彦, 毕玉田, 等. 小青龙汤对哮喘小鼠气道变应性炎症作用的研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(17):2145-2148.

(收稿日期:2017-08-19 修回日期:2017-11-06)