

胰岛素对 β TC-3 细胞胰岛素受体表达的作用

谢利芳 焦 凯[△]

(第四军医大学唐都医院内分泌科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:观察外源性胰岛素对小鼠胰岛 β 细胞瘤细胞株 β TC-3 细胞胰岛素受体表达的影响。方法:采用免疫荧光细胞化学技术结合激光扫描共聚焦显微镜观察高浓度胰岛素(100 IU/ml)刺激不同时间(0 min、30 min、60 min、120 min、240 min)培养的 β TC-3 细胞胰岛素受体的表达,用 Image pro plus 软件对胰岛素受体的荧光强度进行了半定量分析。结果:与 0 min 比较,胰岛素孵育 30 min、60 min、120 min、240 min 时胰岛素受体荧光强度均明显下降($P < 0.05$)。结论:高浓度胰岛素孵育 β TC3 细胞后,可明显下调胰岛素受体的表达,这可能是高胰岛素血症导致胰岛素抵抗产生的机制之一。

关键词 胰岛素;胰岛素受体; β TC-3 细胞;胰岛素抵抗

中图分类号:R335.6 文献标识码:A 文章标号:1673-6273(2011)01-108-03

Effect of Insulin on Expression of Insulin Receptor in TC-3 Cell

XIE Li-fang, JIAO Kai

(Department of Endocrinology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of exogenous insulin on the expression of insulin receptors in mouse insulinoma TC-3 cells. **Methods:** The expression of insulin receptors in TC-3 cells in different incubation time (0 min, 30mins, 60mins, 120mins, 240mins) exposure to 100 IU/ml insulin was analyzed by immune fluorescence cytochemistry combined with laser scanning confocal microscopy. Semi-quantitative analysis of fluorescence intensity of insulin receptors was determined by Image Pro Plus 6.0 software. **Results:** The expression of insulin receptors at 30,60,120 and 240 min was decreased significantly compared with that of 0 min incubated with 100 IU/ml insulin ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of insulin receptor in β TC3 cells was obviously decreased with high concentration insulin incubation, which may be one of the mechanism of insulin resistance caused by hyperinsulinemia.

Key words: Insulin; Insulin receptor; β TC3 cells; Insulin resistance

Chineses library classification: R335.6 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)01-108-03

前言

胰岛素是胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白质激素,在调节细胞增殖、分化和机体血糖稳定中起着重要作用。胰岛素作用的发挥常需与胰岛素受体(insulin receptor, IR)结合,形成配体-受体复合物,进一步激动下游信号传导而产生生物效应。胰岛素受体是受体酪氨酸激酶家族一员,广泛分布于全身各组织细胞膜,近年来研究显示胰岛素受体数目减少和功能退化是胰岛素抵抗形成的重要原因^[1],我们以往研究表明外源性高浓度胰岛素刺激胰岛 β 细胞可使胰岛素信号传导中关键酶磷脂酶 C 1 表达显著下降^[2],然而具体机制不是很清楚,本研究用高浓度胰岛素刺激小鼠胰岛 β 细胞瘤细胞株 β TC-3 细胞,观察其对胰岛素受体表达的影响,进一步探讨胰岛素抵抗的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠胰岛 β 细胞瘤 β TC-3 细胞株由本科室保存, RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司;胎

牛血清为杭州四季青生物材料有限公司产品,胰岛素购自诺和诺德公司;小鼠抗人胰岛素单克隆抗体、罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人胰岛素受体抗体、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 均购自 Abcam 公司。FV1000 激光扫描共聚焦显微镜为日本 Olympus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 β TC-3 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/ml 卡那霉素的 RPMI 1640 培养基 37℃、5% CO₂ 培养箱内进行培养,隔日换液。

1.2.2 细胞爬片和胰岛素干预 待细胞呈对数生长期时,吸掉培养液,用 PBS 缓冲液将细胞洗 2 次,用 0.25%胰蛋白酶室温消化 β TC-3 细胞 3 min 左右,吸掉胰蛋白酶,加入 3mL 培养基吹打成单细胞悬液,4℃,1000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 5 mL 培养液重旋后滴于铺有盖玻片的 6 孔培养板内,常规培养 24~48h,使细胞成单层生长。加入终浓度为 100 IU/ml 的胰岛素进行孵育,根据孵育时间不同分为五个组,为 0 min 组(对照组)、30 min 组、60 min 组、120 min 组、240 min 组,终止孵育后, PBS 洗 2 次,4%多聚甲醛固定 20 min,置于 4℃冰箱保存备用。

1.2.3 免疫细胞化学染色 将盖玻片从 4℃冰箱取出,置于 37℃恒温箱中复温 12 h, PBS 缓冲液振荡 3 次,每次 5 min,擦干盖玻片,滴加小鼠抗人胰岛素单克隆抗体(1:50)、兔抗人胰岛素

作者简介:谢利芳(1982-),女,硕士研究生,主要从事糖尿病发病机制研究, Tel :15339077736, E-mail :summer19820707@163.com

[△]通讯作者:焦凯 教授 E-mail :tdjkai@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-14 接受日期:2010-11-10)

受体抗体 (1:100) 4℃ 冰箱过夜,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。37℃ 恒温箱中复温 1h, PBS 缓冲液振洗 3 次,每次 5min, 滴加罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG(1:50)、FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:250) 37℃ 恒温箱中孵育 1h, PBS 缓冲液振洗 3 次,每次 5min, 50% 缓冲甘油封片。激光扫描共聚焦显微镜观察(激发波长为 567nm 和 488nm), 胰岛素受体荧光强度用 Image Pro plus 6.0 软件进行半定量分析, 计算单位面积累积平均光密度值 (IOD/area)。

1.3 统计学处理

实验数据以均数± 标准差表示($\bar{X} \pm S$), 用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

免疫细胞化学染色后, 激光扫描共聚焦显微镜观察结果如图 2 所示, 红色荧光为细胞表达的胰岛素, 绿色荧光为表达的胰岛素受体, 黄色荧光为胰岛素和胰岛素受体共表达。用 Image Pro plus 6.0 软件对 β TC-3 细胞胰岛素受体的表达进行荧光强度分析, 结果显示: 0 min、30 min、60 min、120 min 和 240 min 五个时间点胰岛素受体免疫反应单位面积累积光密度值如表 1 和图 1。与 0 min 对照组比较, 随着胰岛素作用时间的延长, 胰岛素受体表达逐渐减少, 均有统计学意义($P < 0.05$), 在胰岛素孵育 120 min 时表达最低; 而胰岛素孵育 240 min 时荧光强度逐渐恢复, 与 30 min 时相比较无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 胰岛素受体免疫反应单位面积累积平均光密度值

Table 1 Mean integrated option density of insulin receptor immune reaction

Groups	Mean density($\bar{X} \pm S$)
0 min	0.6627± 0.0451
30 min	0.5382± 0.0722
60 min	0.4697± 0.0885
120 min	0.4177± 0.0788
240 min	0.5468± 0.0544

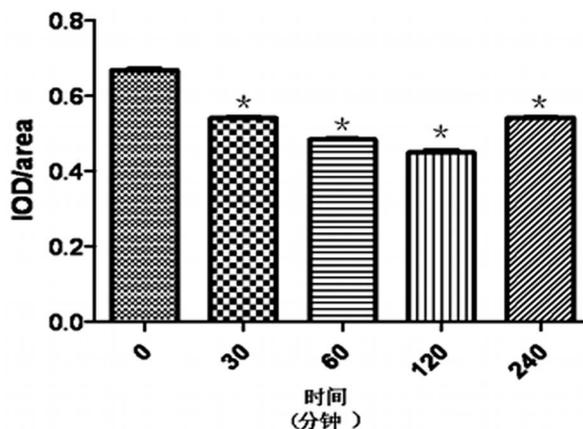


图 1 胰岛素受体免疫反应单位面积累积平均光密度值(与 0 min 比较 * $P < 0.05$)

Fig1 Mean integrated option density of insulin receptor immune reaction (compared with 0 min, * $P < 0.05$)

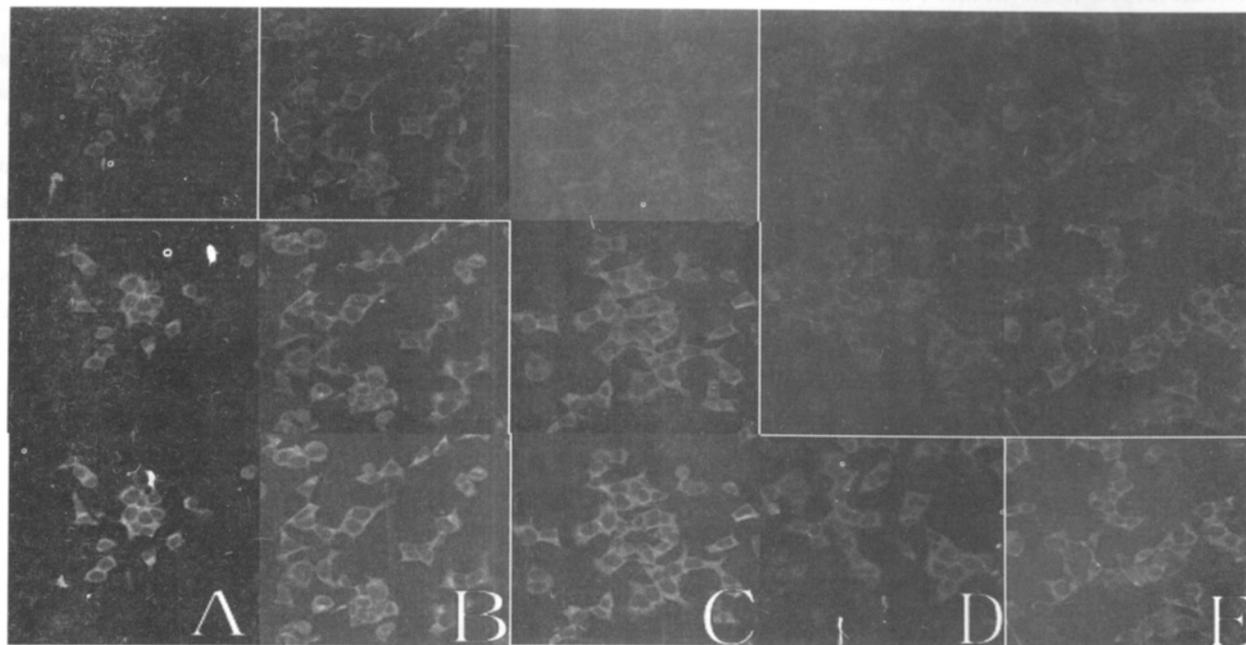


图 2 β TC-3 细胞胰岛素受体和胰岛素的表达(激光共聚焦显微镜图像× 600)

A: 0 min; B: 30 min; C: 60 min; D: 120 min; E: 240 min

Fig2 The expression of insulin receptor and insulin in β TC-3 cells(laser scanning confocal microscopy× 600)

A: 0 min; B: 30 min; C: 60 min; D: 120 min; E: 240 min

3 讨论

胰岛素调节碳水化合物、脂类、蛋白质代谢的作用是通过胰岛素受体实现的。胰岛素与其受体在细胞表面结合后, 触发

细胞内一系列信号传导, 从而发挥胰岛素的生物效应。目前研究已知胰岛素细胞内信号传导有两条途径: 一是胰岛素与其受体结合后, 激活胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS), 进一步活化下游信号分子磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidyli-

nositide-3 kinase, PI-3K) ,从而发挥调节糖、脂肪、蛋白质代谢功能 ;另一条是通过激活 Grb2/SOS 和 RAS 蛋白活化丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径参与细胞生长和生殖。

胰岛素抵抗是指正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态。几乎所有的 2 型糖尿病患者伴有胰岛素抵抗 ,此时患者体内胰岛素的靶器官对胰岛素敏感性下降 ,摄取和处置葡萄糖的能力降低 ,在这种情况下胰岛素分泌代偿性增加 ,胰岛 β 细胞功能负担加重 ,形成高胰岛素血症。当胰岛 β 细胞功能逐渐减弱 ,分泌的胰岛素最终不能使血糖降至正常时 ,即产生高血糖症。目前 ,有关胰岛素抵抗发生机制十分复杂 ,仍不是很清楚^[3]。胰岛素抵抗可发生于器官水平(如肝脏、脂肪和骨骼肌) ,也可以发生自亚细胞和分子水平(包括胰岛素受体前、受体和受体后)。

胰岛素受体是跨膜受体酪氨酸激酶受体家族 ,分别由两个 α 和 β 亚基通过二硫键链接形成 α₂β₂ 异四倍体。α 亚基完全位于细胞外 ,含有与胰岛素的结合位点 ,β 亚基是跨膜结构 ,其胞内部分包含了胰岛素调节的酪氨酸激酶。胰岛素不仅通过肝脏、肌肉和脂肪组织发挥代谢作用 ,而且对胰腺胰岛 β 细胞也具有重要的生理功能^[4]。胰腺胰岛素信号传导的分子机制已经得到了详细的了解^[5] ,有研究显示^[6] 胰岛素受体缺陷的幼年小鼠表现为一系列的代谢疾病 ,包括高血糖症、高脂血症、肝脂肪变性等。肝脏胰岛素受体缺陷的小鼠表现为显著的胰岛素抵抗和糖耐量受损 ,胰岛素抑制肝糖异生障碍^[7]。给肝脏转入人类 cDNA 编码的胰岛素受体基因后 ,小鼠的葡萄糖耐量和高血糖症显著改善^[8]。这表明胰岛素受体在胰岛素信号传导过程中具有不可替代的作用 ,它与胰岛素抵抗和糖尿病发生关系密切。另有研究显示^[9] :用胰岛素长期刺激大鼠脂肪细胞诱导胰岛素抵抗 ,逐渐使胰岛素刺激的葡萄糖转运受损 ,胰岛素信号传导下降 ,胰岛素受体下调。

我们前期研究采用 siRNA 技术干扰 βTC-3 细胞上胰岛素受体表达后 ,可使胰岛素一相分泌显著下降^[2,10] ,而胰岛素一相分泌减弱或缺如是糖尿病发病早期的特征性变化 ;外源性高浓度胰岛素刺激胰岛 β 细胞 ,使胰岛素信号传导分子磷脂酶 C(PLCγ 1)酪氨酸磷酸化水平降低 ,丝氨酸磷酸化增加 ,这证实了胰岛素信号正常传导是葡萄糖刺激的胰岛素分泌的必要条件 ,然而在高胰岛素作用下 βTC-3 细胞胰岛素受体表达是否有变化 ,目前未有报道。本研究发现用高浓度胰岛素(100 IU/ml)作用于 βTC-3 细胞后 ,随着胰岛素作用时间的延长 ,胰岛素受体表达明显下降 ,在刺激 120min 时表达最弱 ,这可能与胰岛素受体和胰岛素结合后 ,使得胰岛素受体内化 ,并有可能致胰岛

素受体降解有关。另外受体节省(receptor sparing)现象也表明 ,机体在处于高胰岛素血症时为缓冲过强的生物效应 ,下调细胞表面受体 ,使细胞对激素的敏感性减低或脱敏(desensitization) ,这与胰岛素信号传导下降 ,2 型糖尿病的发生有密切关系 ;而随着胰岛素孵育时间延长 ,在 240min 时胰岛素受体的表达有恢复的趋势 ,这可能与受体和胰岛素解离后再循环至细胞膜有关 ,然而确切机制仍需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Taylor SI, Accili D, Haft CR, et al. Mechanisms of hormone resistance: lessons from insulin-resistance patients [J]. Acta Paediatr,1994,399 (suppl):95-104
- [2] 李广文,焦凯. 胰岛素作用对胰岛 β 细胞磷脂酶 Cγ 1 表达的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2009,30(19):1944-1946
Li Guang-Wen, Jiao Kai, Effect of insulin function on expression of phospholipase Cγ 1 in β cells [J]. J Fourth MilMed Univ, 2009,30 (19):1944-1946
- [3] Zierath J R, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle [J]. Diabetologia, 2000, (43): 821-835
- [4] Gao Z, Konrad R J, Collins H, et al. Wortmannin inhibits insulin secretion in pancreatic islets and beta-TC3 cells independent of its inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Diabetes, 1996,(45):854-862
- [5] White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. J Biol Chem,1994, (269):1-4
- [6] Accili D, Drago J, Lee EJ, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene [J]. Nat Genet,1996, (12):106-109
- [7] Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction[J]. Mol Cell, 2000, (6): 87-97
- [8] Baudry A, Jackerott M, Lamothe B, et al. Partial rescue of insulin receptor-deficient mice by transgenic complementation with an activated insulin receptor in the liver[J]. Gene, 2002, (299):219-225
- [9] Garvey WT, Olefsky JM, Marshall S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites [J]. Diabetes, 1986,35 (3): 258-267
- [10] 张莉,马丽超,焦凯. 外源性胰岛素对于胰岛素一相分泌的影响[J]. 第四军医大学学报,2007,28(12): 1101-1103
Zhang Li, Ma Li-Chao, Jiao Kai. Effect of exogenous insulin on first phase insulin secretion [J]. J Fourth MilMed Univ, 2007,28 (12): 1101-1103