

# 胰岛素对 $\beta$ 细胞胰岛素分泌的反馈影响

方茂楠 苏晓荣 卫 静 谢利芳 刘 涛

(第四军医大学唐都医院内分泌科 陕西 西安 710038)

**摘要 目的：**探讨不同浓度外源性胰岛素在不同浓度葡萄糖情况下对  $\beta$  TC-3 细胞胰岛素分泌的影响。**方法：**取对数生长期的  $\beta$  TC3 细胞分三组,即低糖组、中糖组、高糖组(葡萄糖浓度分别取 1.0mmol/L、3.0mmol/L、20.0mmol/L)。每组分 0、5、10、15、100、500、5000 和 50000  $\mu$ U/ml 胰岛素八个亚组(其中 0  $\mu$ U/ml 作为对照组)。刺激 10 分钟后取上清液测 C 肽。**结果** 在高糖组中,C 肽分泌量无明显差异;在中糖组中,10  $\mu$ U/ml 和 15  $\mu$ U/ml 两组相对对照组 C 肽分泌量显著增加,50000  $\mu$ U/ml 组 C 肽分泌量则相对对照组出现减少,其余 3 个亚组无明显改变。在低糖组中,C 肽分泌量除 5000  $\mu$ U/ml 组减少外,其它亚组 C 肽分泌量无明显差异。**结论** 胞外胰岛素在适宜葡萄糖浓度时,对  $\beta$  TC3 细胞胰岛素分泌的反馈影响呈剂量依赖关系。

**关键词** 胰岛素  $\beta$  TC-3 细胞 C 肽 酶联免疫法

**中图分类号** Q256.1 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2011) 19-3706-03

## Freeback Effects of Insulin on Insulin Secretion in Beta Cells

FANG Mao-nan, SU Xiao-rong, WEI Jing, XIE Li-fang, LIU Tao

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

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of different concentrations of glucose and insulin on Glucose-stimulated insulin secretion of  $\beta$  TC-3 cells. **Methods:**  $\beta$  TC-3 cells in exponential phase of growth were divided into three groups: low sugar group (1.0mmol/L), middle sugar group (3.0mmol/L), and high sugar group (20.0mmol/L). Each group were subdivided into eight subgroups, with different concentrations of insulin(0, 5, 10, 15, 100, 500, 5000 and 50000m U/ml), taking the subgroup of 0 m U/ml as control. After stimulated for 10 minutes, supernate of each subgroup were collected to detect the c-peptide. **Results:** In high sugar groups, secretions of C-peptide were similar with no obvious difference. In middle sugar groups, secretion of C-peptide in 10m U/ml and 15m U/ml subgroups were obviously increased, while that in 50000 mU/ml subgroup was reduced, compared with the control group; no obvious changes were found in other three subgroups. In low sugar groups, secretion of C-peptide was reduced only in 5000mU/ml subgroup, and other subgroups showed no obvious changes. **Conclusion:** When the extracellular insulin is in suitable glucose concentration, the effect of insulin on glucose-stimulated insulin secretion is dose-dependent.

**Key words:** Insulin;  $\beta$  TC-3 cell; C-peptide; ELISA

**Chinese Library Classification:** Q256.1 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)19-3706-03

### 前言

由于人们不健康的生活方式,全球肥胖发生率越来越高,以及由此引发的 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)患病率逐步上升。世界卫生组织预计在未来十年里,糖尿病病死率增长将超过 50%。糖尿病已严重威胁到人类健康。自从发现  $\beta$  细胞上也有胰岛素受体(insulin receptor,IR)<sup>[1]</sup>,可被已分泌胰岛素反馈影响后续分泌后<sup>[2]</sup>,对于胰岛素的反馈作用的研究日益增多。不过现在对于胰岛素的反馈影响仍然争议极大,正反馈、负反馈以及无作用等都有报道。我们认为胰岛素的反馈作用取决于其所处环境(以葡萄糖浓度为主)。故本研究拟采用不同浓度外源性胰岛素在不同浓度葡萄糖情况下刺激  $\beta$  TC-3 细胞,检测在不同条件下 C 肽分泌量的变化,并分析其量效关系,通过与胰岛素共分泌的 C 肽来观察胞外胰岛素对其自身分

泌的反馈作用,为 2 型糖尿病的分子机制研究提供新的资料。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

小鼠胰岛  $\beta$  细胞瘤  $\beta$  TC-3 细胞株为本科室留存。小牛血清(四季青生物材料有限公司)细胞培养基 RPMI1640 (Gibco 公司);小鼠 C-肽 ELISA 试剂盒(科昊生物工程有限责任公司)全自动酶标仪(北京新凤机电技术公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养  $\beta$  TC3 细胞养于细胞培养箱中,条件为 37℃,5% CO<sub>2</sub>,培养液为含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液。视细胞生长情况,每 3 至 4 日更换培养液或传代 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

#### 1.2.2 C 肽检测

1.2.2.1 细胞对不同浓度葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应(用 C 肽分泌量反应胰岛素分泌量) 取对数生长期  $\beta$  TC-3 细胞分为 7 组,计数使每组含细胞为  $1.5 \times 10^5$  个。用不同浓度的葡萄糖(1.0、3.0、5.6、8.3、11.1、16.7、20.0mmol/L) 分别刺激各组 10 分

作者简介 方茂楠(1983-)男,硕士,主要研究方向 胰岛素 1 相分泌障碍的发生机制研究。电话 :15102977294,

E-mail: fangmn1983@sina.com

(收稿日期 2011-04-28 接受日期 2011-05-23)

钟后,2000rpm 离心 20min。用 EP 管仔细收集上清液,按小鼠 C- 肽 ELISA 试剂盒说明书进行 C 肽浓度测定。

1.2.2.2 外源性胰岛素对  $\beta$  TC-3 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响 (用 C 肽分泌量反应胰岛素分泌量) 取对数生长期的  $\beta$  TC-3 细胞分三组,即低糖组、中糖组、高糖组(葡萄糖浓度参考 1.2.2.1 结果分别取 1.0mmol/L、3.0mmol/L、20.0mmol/L)。每组分为 0、5、10、15、100、500、5000 和 50000 $\mu$ U/ml 胰岛素八个亚组 (其中 0 $\mu$ U/ml 作为对照组), 计数使每个亚组细胞数为  $1.5 \times 10^5$  个。用不同浓度的葡萄糖和胰岛素孵育细胞 10 分钟后,2000rpm 离心 20min。用 EP 管仔细收集上清液,按小鼠 C-肽 ELISA 试剂盒说明书进行 C 肽浓度测定。

1.3 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用 Dunnett-t 检验,以  $P < 0.05$  具有统计学意义。

2 结果

2.1 用不同葡萄糖浓度刺激  $\beta$  tc3 细胞

从 1.0 到 8.3mmol/L, $\beta$  TC-3 细胞 C 肽分泌量迅速增加。葡萄糖浓度从 8.3 到 20mmol/L, $\beta$  TC-3 细胞 C 肽分泌量无明显差异(图 1)。

2.2 外源性胰岛素对  $\beta$  TC-3 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响 (用 C 肽分泌量反应胰岛素分泌量)

在高糖组中,各亚组 C 肽分泌量无明显差异 在中糖组中,10 $\mu$ U/ml 和 15 $\mu$ U/ml 两亚组相对对照组 C 肽分泌量显著增加,50000 $\mu$ U/ml 组 C 肽分泌量减少,其余 3 个亚组相对对照组无明显改变 在低糖组中,除 5000 $\mu$ U/ml 组 C 肽分泌量减少外,其它亚组 C 肽分泌量相对对照组无明显差异(表 1,图 2)。

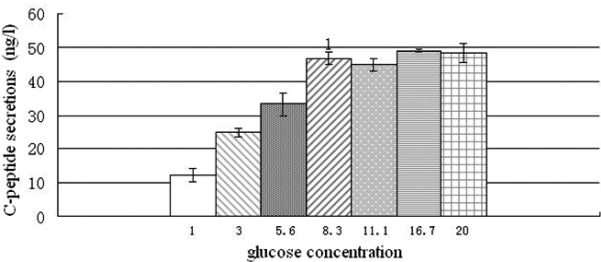


图 1  $\beta$  tc3 细胞对不同浓度葡萄糖刺激的 C 肽分泌反应  
Fig. 1 Effects of different concentrations of glucose on C-peptide secretion of  $\beta$  tc3 cells

表 1 外源性胰岛素在不同葡萄糖浓度时对  $\beta$  TC-3 细胞 C 肽分泌的影响 (n=6,ng/l, $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of exogenous Insulin on C-peptide secretion of  $\beta$  tc3 cells with different concentrations of glucose (n=6,ng/l, $\bar{x} \pm s$ )

| Glucose concentration (mmol/L) | Insulin concentration ( $\mu$ U/ml) |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                | 0                                   | 5                | 10               | 15               | 100              | 500              | 5000             | 50000            |
| 1                              | 12.51 $\pm$ 1.51                    | 12.97 $\pm$ 1.98 | 10.79 $\pm$ 1.85 | 13.46 $\pm$ 1.89 | 12.59 $\pm$ 1.70 | 12.98 $\pm$ 1.54 | 9.44 $\pm$ 1.28  | 10.71 $\pm$ 0.93 |
| 3                              | 24.07 $\pm$ 2.14                    | 28.22 $\pm$ 2.43 | 38.68 $\pm$ 2.35 | 44.14 $\pm$ 3.46 | 24.38 $\pm$ 3.04 | 22.80 $\pm$ 1.70 | 21.06 $\pm$ 1.84 | 19.42 $\pm$ 1.26 |
| 20                             | 46.83 $\pm$ 3.79                    | 46.70 $\pm$ 3.54 | 49.36 $\pm$ 2.46 | 51.64 $\pm$ 3.72 | 48.26 $\pm$ 4.94 | 52.23 $\pm$ 4.08 | 49.43 $\pm$ 4.14 | 49.00 $\pm$ 6.45 |

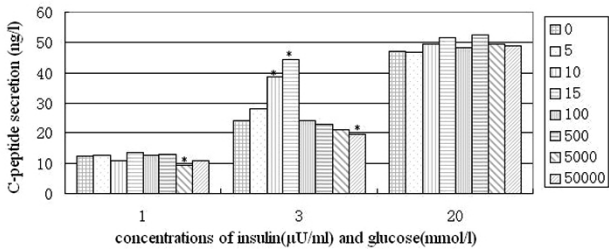


图 2 外源性胰岛素在不同葡萄糖浓度时对  $\beta$  tc-3 细胞 C 肽分泌的影响

Fig. 2 Effects of exogenous Insulin on C-peptide secretion of  $\beta$  tc3 cells with different concentrations of glucose

3 讨论

胰岛素瘤  $\beta$  TC 细胞系是从胰岛素启动子控制下的表达 sv40 大 T 抗原的转基因小鼠肿瘤中建立的。该类细胞系的反应强度和葡萄糖反应阈值在培养过程中会逐渐降低<sup>[3]</sup>。因为本实验所使用  $\beta$  TC3 细胞在既往已培养过多代,且本实验所需细胞量大培养时间长,所以分泌曲线已经发生左移。 $\beta$  TC3 细

胞比耐受性较差的原代  $\beta$  细胞获取、培养容易,当实验所需细胞数量很大时,能经济快捷的达成。但是  $\beta$  TC3 细胞反应强度和葡萄糖反应阈值会逐渐下降,这点使得在多次实验时,容易导致结果不稳定。且作为瘤化的细胞,它的致瘤性转化多程度上影响了正常的信号转导通路和调节通路是未知的,因此  $\beta$  TC3 细胞和原代细胞在科研中各有优缺点,不过科研价值还是稍逊一筹。我们将进一步在原代细胞上进行上述试验的考证。

随着发现胰岛素在葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 中可能具有重要调节作用,以及整条胰岛素信号通路中的各个蛋白都能在胰岛  $\beta$  细胞中找到后,对于胰岛素的自反馈调节作用的研究就成为糖尿病研究中的热点课题。尤其是 2010 年时,在健康人体进行的实验发现外源性胰岛素可以促进后续的葡萄糖刺激的胰岛素分泌。相比给与 4 小时安慰剂,给与 4 小时的胰岛素输入后,葡萄糖刺激的胰岛素分泌显著增加<sup>[4]</sup>。这和之前在动物体内外、细胞系以及人体外实验中得到的结果一起强有力的证明了外源性胰岛素能影响后续的胰岛素分泌。随着研究的进展,学者们建立了越来越多的相关实验模型,胞外胰岛素

在  $\beta$  细胞胰岛素分泌中的作用却仍争议不断<sup>[5-11]</sup>,综合后可分为四种:1、一个负调节因子 2、一个正反馈因子 3、一个必要的组成部分 4、未参与。

胰岛素与胰岛素受体结合后主要经由两条信号途径发挥生理作用:一是通过 Ras/ 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径<sup>[12]</sup>;二是通过 PI3K 信号途径,即 IRS/PI3K/ PDK1/PKB 等。PI3K 信号途径中的各个蛋白大多在多个实验中被发现与胰岛素分泌相关<sup>[7,9,13]</sup>。Sung-Hee Park 等发现在低糖或高糖时,胰岛素对于  $\beta$  细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌作用相反<sup>[14]</sup>。并且 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 在高糖和低糖时 T172 磷酸化程度相反,在与胰岛素刺激后则反转,与该实验中胰岛素在低糖或高糖时对  $\beta$  细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌作用想一致,提示 AMPK 可能参与了胰岛素对葡萄糖刺激的胰岛素分泌反馈作用。加之 AMPK 作为细胞能量监测器,在低糖或高糖时,胞内 AMP/ATP 比例改变,使 AMPK 激活或抑制,有可能作为触发器,诱导胰岛素发挥截然相反的作用。

本实验中,在高糖组中,各亚组 C 肽分泌量无明显差异 在中糖组中,10 $\mu$ U/ml 和 15 $\mu$ U/ml 两亚组相对对照组 C 肽分泌量显著增加,5000 $\mu$ U/ml 组 C 肽分泌量减少;在低糖组中,除 5000 $\mu$ U/ml 组 C 肽分泌量减少外,其它亚组 C 肽分泌量相对对照组无明显差异。也就是说在 3.0mM 的葡萄糖浓度时,对自身分泌呈现一个浓度依赖性的反馈影响。而在高糖或低糖时,则作用不明显。在适当葡萄糖刺激 (3.0mM) 时,在低浓度胰岛素时 (10 $\mu$ U/ml 和 15 $\mu$ U/ml),促进胰岛素分泌;中等浓度时 (100 $\mu$ U/ml、500 $\mu$ U/ml 和 5000 $\mu$ U/ml),对胰岛素分泌无影响;在高浓度时 (50000 $\mu$ U/ml),抑制胰岛素分泌。这一现象符合机体的生理要求,即在血胰岛素浓度低时,促进胰岛素分泌,防止血糖过高 在血胰岛素浓度过高时,抑制胰岛素分泌,防止血糖过低,将胰岛素水平维持在一个最有效点(sweet spot)<sup>[15]</sup>。不过具体机理仍有待探索。是否有无可能似 Sung-Hee Park 实验中的一样,如 AMPK (或是其他能感受胞内能量变化的蛋白) 一样的某个信号蛋白,在适宜浓度时促发某个未知信号途径,使胰岛素信号在低浓度或高浓度时被反转。这将是我們下一步的研究目标,探索胰岛素在不同浓度时, $\beta$  细胞胞内信号的变化,及其反馈作用于胰岛素分泌的关系。

而在高浓度及低浓度葡萄糖时,不同浓度胰岛素对葡萄糖刺激的胰岛素分泌反馈作用差异不大,这是否仅仅只是  $\beta$  tc3 细胞的致瘤性转化影响细胞胞内正常的信号转导通路和调节通路导致的,还是葡萄糖在高浓度及低浓度时,其胞内信号很强,远大于胰岛素的影响,使胰岛素的反馈影响表现不出来。下一步在原代  $\beta$  细胞上的类似实验将有助于对这一问题的探讨。

综上所述,本研究发现 在  $\beta$  tc3 细胞中,在适宜葡萄糖浓度时 (3mmol/l),胰岛素对自身分泌影响呈现一个浓度依赖性关系。而在高浓度和低浓度时,胰岛素对自身分泌影响不大。但其具体机制仍需进一步研究。另外  $\beta$  tc3 细胞虽然使用经济快

捷,但是其反应强度和葡萄糖反应阈值会逐渐下降,且信号转导通路和调节通路与正常细胞相比可能改变,使得  $\beta$  tc3 细胞的科研价值稍逊于原代细胞。

#### 参考文献(References)

- [1] M.F. White, C.R. Kahn. The insulin signaling system[J]. J Biol Chem, 1994, 269:1-4
- [2] C.A. Aspinwall, J.R. Lakey, R.T. Kennedy. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells [J]. J. Biol. Chem, 1999,274: 6360-6365
- [3] Hans E. Hohmeier, Christopher B. Newgard. Cell lines derived from pancreatic islets [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 228:121-128
- [4] C Bouche, X Lopez, A Fleischman, et al. Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans [J]. PNAS, 2010,107(10):1070-4775
- [5] Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, et al. 2000. Disruption of insulin receptor substrate2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia[J]. Diabetes, 2000,49:1880-1889
- [6] SHIMON EFRAT. Regulation of Insulin Secretion:Insights from Engineered  $\beta$  -cell Lines[J]. Ann NY Acad, Sci, 2004,1014: 88-96
- [7] Cantley J, Choudhury AI, Asare-Anane H, Selman C, Lingard S, et al. Pancreatic deletion of insulin receptor substrate 2 reduces beta and alpha cell mass and impairs glucose homeostasis in mice[J]. Diabetologia, 2007,50:1248-1256
- [8] Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML. Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats[J]. Nat Neurosci, 2000, 3:757-758
- [9] Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, et al. Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic cells causes overt diabetes [J]. Nat Genet, 2006,38:583-588
- [10] Shanta J. Persaud, Dany Muller and Peter M. Jones. Insulin signalling in islets.[J]. Biochemical Society Transactions, 2008, 36:290-293
- [11] Uhles S, Moede T, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB. Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. FASEB J, 2007,21:1609-1621
- [12] Jennifer L. Beith, Emilyn U. Alejandro, and James D. Johnson, Insulin Stimulates Primary  $\beta$  -Cell Proliferation via Raf-1 Kinase. Endocrinology, 2008,149: 2251-2260
- [13] Lynda Elghazi, Norman Balcazar, Ernesto Bernal-Mizrachi. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic  $\beta$  -cell mass and function [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006,38: 157-163
- [14] Sung-Hee Park, So-Yeon Kim, Won-Ki Baek, et al. Regulation of glucose-dependent insulin secretion by insulin: Possible role of AMP-activated protein kinase[J]. Life Sciences, 2009, 85: 178-183
- [15] James D. Johnson and Emilyn U. Alejandro, Control of pancreatic  $\beta$  -cell fate by insulin signaling:The sweet spot hypothesis [J]. Cell Cycle, 2008,7(10): 1343-1347