

• 论 著 •

新型 hGLP-1 基因对 β -TC-6 胰岛瘤细胞凋亡的影响*

黄常洪, 李晓丽, 代国知, 廖晓梅, 袁红霞

(湖南省郴州市第一人民医院南院检验科 423000)

摘要:目的 探讨新型人胰高血糖素样肽-1(hGLP-1)类似物基因(2×Val2-hGLP-1)对四氧嘧啶(AXN)诱导凋亡的 β -TC-6 胰岛瘤细胞株的影响。方法 脂质体介导重组质粒 pIRES2-EGFP/2×Val2-hGLP-1 转染 β -TC-6 胰岛瘤细胞, 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(GFP), 酶联免疫吸附法(ELISA)检测目的蛋白表达; 以 AXN 诱导细胞凋亡后观察细胞形态, Hoechst 染色及四甲基偶氮唑盐光吸收法(WST-1)检测目的基因表达对细胞凋亡的影响。结果 荧光显微镜观察到 GFP 表达; ELISA 显示重组质粒转染组细胞培养液吸光度值为(2.53±0.05), 高于其他研究组($P<0.05$); 细胞形态观察及 Hoechst 染色显示, AXN 可诱导 β -TC-6 细胞凋亡; WST-1 显示转染重组质粒的细胞组存活率为 66.23%, 高于其他研究组($P<0.05$); Hoechst 染色显示, 经重组质粒转染的细胞凋亡减少。结论 2×Val2-hGLP-1 的表达对胰岛 β 细胞凋亡具有一定抑制作用, 为糖尿病基因治疗提供了相关试验研究基础。

关键词:细胞凋亡; 新型 hGLP-1 基因; β -TC-6 胰岛瘤细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1438-03

Research on the effect of a novel hGLP-1 analog gene in AXN-induced β -TC-6 cells*

Huang Changhong, Li Xiaoli, Dai Guozhi, Liao Xiaomei, Yuan Hongxia

(Department of Clinical Laboratory, Chenzhou No. 1 People's Hospital, Hu'nan 423000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of a novel hGLP-1 analog gene(2×Val2-hGLP-1) on alloxan(AXN)-induced apoptosis in β -TC-6 cells. **Methods** β -TC-6 cells were transfected with recombinant expression plasmid pIRES2-EGFP/2×Val2-hGLP-1 by cationic liposome. The expression of green fluorescent protein(GFP) was observed by fluorescent microscopy, and of hGLP-1 in the cultural media was determined by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). After being induced by, the effect of 2×Val2-hGLP-1 on β -TC-6 cells were determined by microscope observation, Hoechst staining and MTT assay. **Results** The expression of GFP were obtained. The optical density of cultural media from recombinant plasmid transfected group was 2.53±0.05, and higher than other groups($P<0.05$). Morphologic observation and Hoechst staining confirmed the apoptosis of β -TC-6 cells, induced by AXN. MTT assay indicated that the survival rate of recombinant plasmid transfected group(66.23%) was higher than other groups($P<0.05$). **Conclusion** The expressioin of 2×Val2-hGLP-1 could inhibit the apoptosis of β -TC-6 cells, which lays an experimental foundation for the gene therapy of diabetes mellitus.

Key words:apoptosis; a novel hGLP-1 analog gene; β -TC-6 cells

人胰高血糖素样肽-1(human glucagon-like peptide-1, hGLP-1)是肠道 L 细胞分泌的由 30 个氨基酸残基组成的肠促胰岛素激素, 对胰岛 β 细胞的分化、增殖起重要作用, 具有促进胰岛素分泌、降低血糖的作用^[1-2]。由于 Hglp-1 第 2 位氨基酸为丙氨酸, 在体内容易被二肽酰基肽酶 IV(dipeptidyl peptidase IV, DPP IV)降解, 限制了其临床应用^[3]。笔者在前期实验中对第 2 位氨基酸进行了突变(将 N 末端第 2 位丙氨酸 Ala2 突变为缬氨酸 Val2)以抵抗 DPP IV 降解作用, 并将 Val2-hGLP-1 类似物基因进行串联并将其插入真核表达载体中^[4]。本实验以诱导凋亡的 β -TC-6 细胞为基础, 初步探讨新型 hGLP-1 类似物基因对其凋亡的影响, 为糖尿病基因治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒与试剂 小鼠胰岛素瘤细胞株 β -TC-6 由广东医学院生化研究所张志珍教授馈赠。重组表达质粒 pIRES2-EGFP/2×Val2-hGLP-1 由本科室构建并保存。DMEM 液体培养基、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠(GIBICO, 美国), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine 2000(Invitrogen, 美国), 水溶性四唑盐-1(water-soluble tetrazolium-1,

WST-1)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Hoechst 染色试剂盒(碧云天, 上海), 四氧嘧啶(alloxan, AXN; Sigma, 美国)、鼠抗 hGLP-1 抗体(Santa, 美国), 羊抗鼠 IgG-HRP(中杉金桥, 北京)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以含 15% FBS 的 DMEM 完全培养基(含谷氨酰胺和丙酮酸钠), 37℃、5%二氧化碳孵箱中培养 β -TC-6 细胞。

1.2.2 脂质体转染及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)观察 调整 β -TC-6 细胞浓度至 5×10^5 /L, 按每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 培养 48 h, 换不含 FBS 和抗菌药物的培养基培养。以[载体(μ g):脂质体(μ L)]=1:2 的比例按说明书进行转染, 24 h 后观察绿色荧光蛋白的表达并在每孔的四角和中间各取 1 个视野, 计算细胞总数和 GFP 阳性细胞, 根据公式:转染效率=GFP 阳性细胞/细胞总数, 计算转染效率。

1.2.3 细胞培养液 hGLP-1 含量检测 调 β -TC-6 细胞浓度至 5×10^5 /L, 按每孔 200 μ L 接种于经多聚赖氨酸处理的 24 孔板中, 细胞融合度为 80%时按照上述方法进行转染, 以转染空载体和不进行转染的细胞同等条件培养为对照, 每孔设 6 个

* 基金项目:郴州市第一人民医院资助课题(N2008075)。

复孔,培养 24 h 后吸出培养液,14 000 g 离心 30 min,取上清液作为抗原进行间接酶联免疫吸附法检测。具体操作步骤为:每孔加碳酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 9.6)150 μ L,培养液上清 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 过夜后用 0.01 mol/L PBS-Tween20 洗 5 次,每次 5 min;加入 FBS 浓度为 10 ml/L 的 PBS-Tween20,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h,清洗(方法同上);加入稀释 1 000 倍的鼠抗 hGLP-1 抗体工作液每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,清洗;加入稀释 2 000 倍的羊抗鼠 IgG-HRP,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,清洗(方法同上);每孔加底物液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后加 50 μ L 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应;用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度。以未用于培养细胞的培养液及空载体转染细胞培养液作为阴性对照。

1.2.4 AXN 诱导细胞凋亡及 Hoechst 染色 将 β -TC-6 细胞浓度调至 5×10^5 /L,按每孔 2 mL 接种于 6 孔板。将细胞随机分为 3 组(每组 6 孔):A 组为正常对照组;B 组为 AXN 诱导重组载体转染组;C 组为 AXN 诱导凋亡组。细胞融合度达 80% 时,B 组进行转染继续培养 24 h;B、C 组更换为 AXN 浓度为 4 mmol/L 的培养液,培养 20 h 后光镜下观察细胞形态变化;按说明书进行 Hoechst 染色,荧光显微镜观察细胞核形态变化。

1.2.5 WST-1 检测细胞增殖及细胞毒性改变 将 β -TC-6 细胞培养至对数生长期,消化成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^8 /L,按每孔 100 μ L 加入 96 孔板,并随机分为正常对照组(A 组)、AXN 诱导重组载体转染组(B 组)、AXN 诱导凋亡组(C 组)、AXN 诱导空载体转染组(D 组),每孔设 6 个复孔。当细胞融合度达 80% 时进行转染,转染后继续培养 24 h,B、C、D 组分别加入 4 mmol/L AXN 溶液每孔 100 μ L,培养 20 h 诱导凋亡;WST-1 试剂盒检测,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。组间比较采用 *t* 检验,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pIRES2-EGFP/2 $\times$ Val2-hGLP-1 转染 β -TC-6 细胞的转染效率 将细胞转染 24 h 后,在荧光显微镜下可以观察到 GFP 表达(图 1),经计算转染效率达 50% 以上。

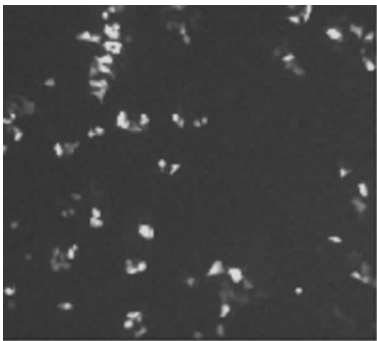


图 1 GFP 在 β -TC-6 细胞中的表达($\times 100$)

2.2 细胞培养液 hGLP-1 含量检测 各组细胞培养液检测 hGLP-1 吸光度值结果见表 1。

2.3 β -TC-6 细胞经 AXN 诱导后形态变化 正常 β -TC-6 细胞呈多边形贴壁生长,细胞间隙紧密(图 2A);AXN 诱导 20 h 后,细胞体积缩小,细胞失去突触,间隙明显增大并皱缩呈球形变圆,逐渐漂浮于培养液中,培养液中可见细胞碎片(图 2B)。

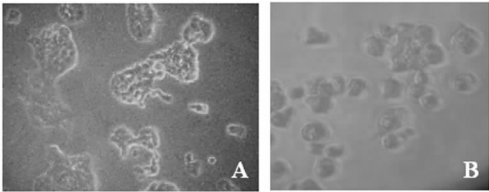
2.4 Hoechst 染色后各组细胞核形态变化 经 Hoechst 染色后,荧光显微镜下可见对照组细胞染色质均匀一致,呈弥散均

匀荧光(图 3A);经 AXN 诱导后,细胞呈现凋亡特征性变化,即荧光增强,胞核缩小碎裂,呈大小不等的不规则块状、圆形或花瓣状的碎片(图 3B、C)。与 B 组细胞核固缩状态相比,C 组细胞凋亡状态明显,呈现明显的核碎裂现象。

表 1 各组培养液作为抗原时吸光度值的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

培养液	吸光度
未经细胞培养的培养液	0.53 $\pm$ 0.02
经细胞培养的培养液	2.08 $\pm$ 0.04
经空载体转染的细胞培养液	2.10 $\pm$ 0.02
经重组质粒转染的细胞培养液	2.53 $\pm$ 0.05*

* : $P<0.05$,与其余培养液吸光度值比较。



A:正常对照 β -TC-6 细胞($\times 200$);B:经 AXN 诱导 20 h 后的 β -TC-6 细胞($\times 200$)

图 2 AXN 诱导前后细胞形态变化



A:正常对照 β -TC-6 细胞;B:转染重组载体并经 AXN 诱导 20 h 后的 β -TC-6 细胞;C:转染空载体并经 AXN 诱导 20 h 后的 β -TC-6 细胞。

图 3 重组载体转染对细胞凋亡的影响($\times 200$)

2.5 WST-1 检测细胞增殖及细胞毒性改变 不同处理组细胞经 WST-1 检测吸光度值及细胞存活率结果见表 2。

表 2 各组细胞 WST-1 检测吸光度值及存活率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	吸光度	细胞存活率(%)
正常对照组	0.382 $\pm$ 0.021	100.00
AXN 诱导重组载体转染组	0.253 $\pm$ 0.013*	66.23 $^{\#}$
AXN 诱导空载体转染组	0.221 $\pm$ 0.051	57.85
AXN 诱导凋亡组	0.218 $\pm$ 0.047	57.06

* : $P<0.05$,与其他各组吸光度比较; $^{\#}$: $P<0.05$,与其他各组细胞存活率比较。

3 讨 论

近年来,糖尿病的患病率在世界各国迅速增长,在发展中国家更呈流行态势^[5]。糖尿病的发病与胰岛 β 细胞功能密切相关,而胰岛 β 细胞的凋亡是导致胰岛 β 细胞功能障碍的重要因素^[6-7]。hGLP-1 在胰岛 β 细胞的增殖、分化及凋亡中发挥重要作用^[8]。本实验以前期所构建的 2 $\times$ Val2-hGLP-1 真核表达载体为基础,以 β -TC-6 胰岛瘤细胞为凋亡模型,通过基因转染观察新型 hGLP-1 基因对其凋亡的影响。

pIRES2-EGFP 为真核表达载体,通过脂质体转染法可将携带目的基因的重组载体转染入细胞内。pIRES2-EGFP 是以 GFP 作为报告基因的真核表达载体,属于双顺反子表达模式,

其多克隆位点和 EGFP 编码区基因之间设计有核糖体进入位点,确保插入的 hGLP-1 基因与 GFP 编码基因共同转录,但翻译合成的 hGLP-1 并不与 GFP 融合,可保证 hGLP-1 的构象与生理活性。脂质体作为体内和体外输送载体的工具,其介导的外源基因导入法以无毒、无免疫原性,简单高效而备受青睐^[9]。采用以上载体和转染方法即可在保证目的蛋白的天然生理活性,也可获得较高的转染效率和表达量。GFP 观察及细胞培养液 hGLP-1 含量检测结果均提示重组载体成功转染至靶细胞,且目的基因得以表达。

β-TC-6 细胞是以经 SV40 病毒转染的胰岛细胞为基础构建的,有较好的稳定性,能够分泌胰岛素、胰高血糖素和生长抑素,对氧化损伤敏感,可作为研究 GLP-1 功能的来源细胞。目前认为,AXN 通过产生超氧自由基,损伤细胞膜结构而导致胰岛 β 细胞受损。氧自由基可造成细胞膜产生脂质过氧化作用,线粒体氧化应激使胞内活性氧增加,进而触发核因子 κB(nuclear factor, NF-κB)、C-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、丝裂原活化蛋白激酶 p38 亚族(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)的激活,从而诱导胰岛 β 细胞的凋亡^[10]。本研究中, Hoechst 染色显示,经诱导后 β-TC-6 细胞核体积缩小,形态变圆,出现明显的核碎裂现象,说明 AXN 可诱导 β-TC-6 细胞凋亡,尽管转染空载体和转染重组载体的细胞均出现了细胞凋亡现象,但多数转染空载体的细胞已处于核碎裂阶段,而多数转染重组载体的细胞都处于核固缩状态。WST-1 在电子耦合剂存在的情况下,可以将线粒体内的部分脱氢酶还原为橙黄色的甲月替(formazan)。细胞增殖越快,颜色越深,细胞毒性越大,颜色越浅;颜色的深浅与吸光度值成正比。本研究中, WST-1 实验结果显示,转染重组载体后细胞的毒性作用减低。综上所述,经重组载体转染后的细胞毒性减低,凋亡率下降。

体外实验表明,若在诱导大鼠胰岛细胞 RINm5f 凋亡的同时将 GLP-1 加入细胞培养液中, RINm5f 细胞内抗凋亡基因 Bcl-2 表达增加,而凋亡基因 BAX 表达下降,说明 GLP-1 对胰岛细胞的抗凋亡作用源于其对凋亡相关基因的调控^[11]。也有研究发现, GLP-1 能够通过抑制 NF-κ B 的表达,而抵抗由白介素-1β 介导的大鼠胰岛素细胞 INS-1 的凋亡^[12]。本研究采用基因转染的方式,将 2×Val2-hGLP-1 成功转染入 AXN 诱导

凋亡的 β-TC-6 细胞,并使其分泌,发现 hGLP-1 的表达对胰岛 β 细胞的凋亡具有一定的影响。笔者将在后续实验中在细胞内基因表达水平对 hGLP-1 抗凋亡机制进一步研究,为糖尿病的基因治疗提供一定的实验基础。

参考文献

[1] Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival[J]. Diabetes Metab, 2008, 34(2): 73-77.

[2] Ranagnath LR. Incretins: physiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulin tropic polypeptide and glucagon-like peptide-1[J]. J Clin Pathol, 2008, 61(4): 4012-4091.

[3] Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. Saxagliptin: a new DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Adv Ther, 2009, 26(3): 249-262.

[4] 李晓丽, 刘振, 张志珍. 人胰高血糖素样肽-1 类似物基因克隆及真核表达载体构建[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(7): 3046-3049.

[5] 李明, 王超, 刘跃平, 等. 糖尿病主要临床化学检测指标应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 199-200.

[6] 冯春颜, 张永顶, 胡纪文. 免疫印迹法检测 I 型糖尿病自身抗体的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 593-594.

[7] Chang-chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(4): 329-343.

[8] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1[J]. Physiol Rev, 2007, 87(4): 1409-1439.

[9] 张蕾, 郭克民, 温洪涛, 等. Bcl-Xl 基因反义寡核苷酸诱导食管癌细胞凋亡的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(9): 953-956.

[10] Ye YL, Yuan ZY, Shen B, et al. Diabetes mouse model made by alloxan[J]. Lab Animal Sci Adminstrat, 2001, 18(2): 54-59.

[11] 崔岱, 刘超, 唐伟. GLP-1 对大鼠胰岛细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(5): 310-312.

[12] Li SJ, Xue YM, Li J, et al. Glucagon-like peptide-1 protects INS-1 cells from interleukin-1β-induced damage by inhibiting the nuclear factor-kappaβ pathway[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010, 30(9): 2119-2121.

(收稿日期: 2011-01-13)

(上接第 1437 页)

peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): 592-603.

[6] Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(8): 2503-2511.

[7] 晋淑慧, 王艾丽, 王娟, 等. 抗 Sa、抗 KA、抗 RA54 抗体和 RF 联合检测对类风湿性关节炎诊断的意义[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(3): 178-180.

[8] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(1): 155-163.

[9] Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(2): 142-150.

[10] Dejaco C, Klotz W, Larcher H, et al. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis

[J/OL]. Arthritis Res Ther, 2006[2010-12-25], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779400/>.

[11] Ménard HA, Lapointe E, Rochdi MD, et al. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system[J]. Arthritis Res, 2000, 2(6): 429-432.

[12] Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(8): 1831-1835.

[13] 戴冽. 抗环瓜氨酸肽抗体检测在关节病中的临床应用[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(4): 315-317.

[14] Silveira IG, Burlingame RW, von Mühlen CA, et al. Anti-CCP antibodies have more diagnostic impact than rheumatoid factor (RF) in a population tested for RF[J]. Clin Rheumatol, 2007, 26(11): 1883-1889.

(收稿日期: 2011-01-09)