

文章编号 1006-8147(2014)02-0098-04

论 著

# 大鼠小肠分泌胰岛素基因水平研究

甘文学, 张 瑞, 张 欣, 汪蓓蕾, 郭 刚

(天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津 300070)

**摘要** 目的:明确小肠内胰岛素的存在情况及其表达水平。方法:8周龄雄性 Wister 大鼠,禁食 24 h,灌胃 50%葡萄糖溶液、牛血清白蛋白溶液、油脂悬液各 2 mL,分别灌胃后在第 0、5、10、15、20、25 min 时脱臼处死,按不同时间段分为 6 组,取其胰腺、十二指肠。提取各组织总 RNA,反转录成 cDNA,普通 PCR 检测胰岛素 mRNA 的存在,实时荧光定量 PCR 检测不同时刻胰腺和十二指肠胰岛素 mRNA 的相对表达量。结果:反转录普通 PCR 在大鼠十二指肠中扩增出胰岛素基因片段(经测序证实与胰岛素基因序列完全一致);十二指肠与胰腺胰岛素 mRNA 的相对表达量有显著差异( $P<0.05$ ),远远低于胰腺组织。灌胃后胰腺和十二指肠分泌胰岛素的表达水平呈动态变化,且十二指肠分泌胰岛素的表达高峰晚于胰腺。结论:该实验证实了除胰岛  $\beta$  细胞外十二指肠组织具有分泌胰岛素的功能,灌胃后十二指肠胰岛素 mRNA 的相对表达量呈动态变化,从而推测糖尿病的一种可能发病机制。

**关键词** 小肠;胰岛素;实时荧光定量 PCR;肠源胰岛素;大鼠

中图分类号 R587.1

文献标志码 A

## Research on gene level of small intestine secreting insulin in rats

GAN Wen-xue, ZHANG Rui, ZHANG Xin, WANG Bei-lei, GUO Gang

(Institute of Endocrinology, Metabolic Disease Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To identify the existence and the expression level of small intestine insulin mRNA. **Methods:** The Wister rats by irrigation with 50% glucose solution, bovine serum albumin solution and oil suspension were executed at 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, according to which the rats were divided into six groups before the sample of pancreas and duodenum were obtained. Total RNA were extracted from tissues. Reverse transcriptase PCR detected the existence of insulin mRNA in each tissue and real-time fluorescence PCR detected insulin mRNA expression in each part of duodenum and pancreas. **Results:** Reverse transcriptase PCR amplified gene sequencing in the small intestine insulin (completely consistent with insulin genetic sequences). Based on detection by real-time fluorescent quantitative PCR, the insulin mRNA relative expression in duodenum was significantly lower than that in pancreas ( $P<0.05$ ). The insulin expression levels in duodenum and pancreas were dynamic, and the insulin expression peak of the duodenum was later than that of pancreas. **Conclusion:** The research shows that the small intestine tissues secrete insulin except for pancreatic islet  $\beta$  cell. The insulin expression levels in duodenum and pancreas are dynamic, and thus can be viewed as a possible pathogenesis for diabetes.

**Key words** intestine; insulin; real-time fluorescence quantitative PCR; enterogenous insulin; rat

Ⅱ型糖尿病是以长期高血糖为特征的复杂的疾病,病因的异质性是遗传和与环境因子共同作用的结果。胰岛素分泌受损、胰岛素敏感性降低是重要的病理生理学特征,是造成Ⅱ型糖尿病高血糖的原因<sup>[1]</sup>。以往的观点认为,动物组织胰腺的 $\beta$ 细胞具有分泌胰岛素的功能,在糖代谢中促进细胞对血糖的利用,从而起到降低血糖的作用<sup>[2-5]</sup>。但有研究结果显示某些物质可以诱导十二指肠上皮细胞分化成分泌胰岛素的细胞<sup>[6-8]</sup>,说明了十二指肠上皮细胞可以用于胰岛素的基因或细胞治疗。这提示十二指肠分泌胰岛素与糖尿病发病可能密切相关。据此我们推测十二指肠组织可能具有分泌胰岛素的功能,

希望可通过本实验证实这一假设。

### 1 材料和方法

1.1 材料 8周龄雄性 Wister 大鼠 78 只 (SPF 级) 购自维通利华实验动物技术有限公司;Trizol、逆转录试剂盒为 Fermentas 公司生产;琼脂糖、焦碳酸二乙酯 (DEPC) 为 Sigma 公司产品;核酸分子量标准 DNA Marker DL-2000 购自精美生物工程公司;实时定量 PCR 试剂盒为宝生物工程 (大连) 有限公司生产;溴化乙锭 (EB) 购自北京鼎国生物技术公司;氯仿、异丙醇、75%乙醇、甲醛等其他试剂均为国产的分析纯产品。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物的取材 采用 8 周龄雄性 Wister 大鼠 78 只,分为 3 组,灌糖组、灌脂组、灌蛋白组,

作者简介 甘文学 (1985-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 郭刚, guogangtj@126.com。

每组大鼠注射总热量均控制在 4 kcal 左右 (70 kcal 为正常成年大鼠日常规进食热量),即葡萄糖 1 g,豆油 0.45 g (1 g\*4/9),牛血清白蛋白 2 mL。禁食 24 h, (1)葡萄糖组共 42 只大鼠,随机分为 6 组,每组共 7 只大鼠,2 只作为对照,灌胃生理盐水 2 mL;其他 5 只为实验组,灌胃 50%葡萄糖溶液 2 mL。(2)灌脂灌蛋白组共 36 只,随机分为 3 组,禁食 24 h,正常对照组 12 只,灌胃生理盐水 2 mL;灌脂组 12 只,灌胃 22%油脂悬浮液 2 mL;灌蛋白组 12 只,灌胃牛血清白蛋白 2 mL。每组分别于灌胃后 0、5、10、15、20、25 min 后脱臼处死,分别取其胰腺、十二指肠,每只鼠重复 3 次, -80 ℃保存备用。经过前期的实验研究,十二指肠分泌胰岛素的量远远高于空肠、回肠,胰岛素的分泌与十二指肠有密切关系,所以本次实验小肠部分取十二指肠。

**1.2.2 总 RNA 的提取和反转录合成 cDNA** 分别取 100 mg 左右的胰腺、十二指肠,按 Invitrogen 公司的 Trizol 说明书提取各组织总 RNA<sup>[9]</sup>,采用 Fermentas 公司的逆转录试剂盒按说明书进行 5 μg 总 RNA 20 μL 体系逆转,各管分别加入 5 μg 总 RNA 样品, Oligo (dT) 18 1 μL (1g/L), DEPC 水补齐,总体积 12 μL。混匀后 10 000 r/min 瞬时离心 5 s, 65 ℃ 10 min 后立即冰浴;加入 5×Buffer 4 μL, 0.1 mol/L DTT 2 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL (40 U), 再加入 M-MLV 1 μL (200 U), 总体积 20 μL, 混匀, 10 000 r/min 瞬时离心 5 s, 42 ℃ 60 min, 70 ℃ 5 min, -20 ℃ 保存。

**1.2.3 普通 PCR 鉴定各组织胰岛素 mRNA 的存在情况** 利用 Gene Runner 软件设计胰岛素引物序列,并经 NCBI BLAST 检索无显著同源性序列为:上游引物 5'-TCTACACACCCAAGTCCC-3', 下游引物 5'-CACAATGCACGCTTCTCG-3', 扩增产物片段为 131 bp; 管家基因 GAPDH 上游引物 5'-TTCAACG GCACAGTCAAG-3', 下游引物 5'-CGACATACTCA-GCACCAG-3', 扩增产物片段为 121 bp; 反应条件: 94 ℃预变性 2 min; 变性 95 ℃ 15 s, 58 ℃ 15 s, 72 ℃ 20 s 共 40 个循环, 72 ℃再延伸 5 min。取 5 μL 的扩增产物 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,其余产物送至北京博迈德科技发展有限公司进行测序。

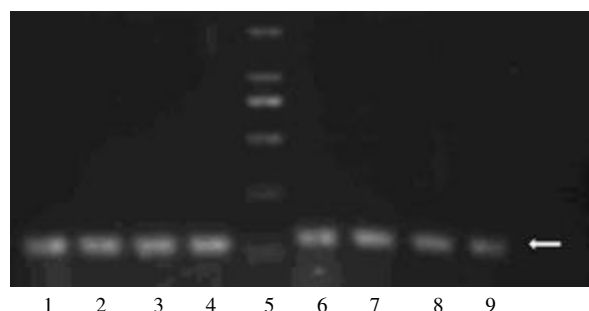
**1.2.4 RT-PCR 检测 Insulin 及管家基因 GAPDH 的表达水平** C1000™ Thermal Cycler 定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。扩增条件如下: 总体积 20 μL, 含 SYBR green MIX 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 2 μL, 双蒸水 7.0 μL; 反应条件为: 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 15 s, 58 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循

环, 72 ℃再延伸 5 min。通过测定 PCR 产物的动态累积量, 获得样品的扩增曲线。用待测样品  $2^{-\Delta CT}$  值表示目的基因相对表达量<sup>[10]</sup> (CT 是每个反应管内的荧光信号到达一定域值时所经历的循环数; 样品  $\Delta CT = \text{目的基因 CT 值} - \text{GAPDH CT 值}$ )。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS13.0 统计软件处理实验数据, 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-t 检验,  $P < 0.05$  被认为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 普通 PCR 的琼脂糖凝胶电泳** 结果见图 1。



1, 2: 胰腺 GAPDH 引物扩增片段; 3, 4: 十二指肠 GAPDH 引物扩增片段; 5: DNA marker DL2000 由上至下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 6, 7: 胰腺胰岛素引物扩增片段; 8, 9: 十二指肠胰岛素引物扩增片段

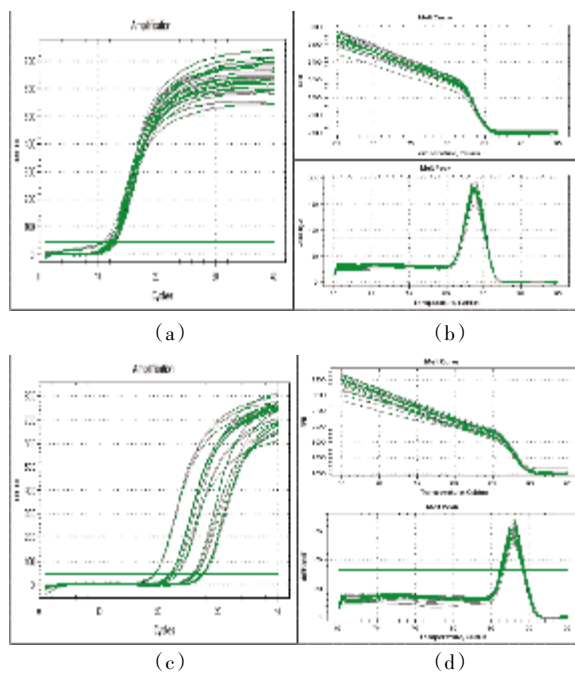
图 1 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 1.5% agarose gel electrophoresis

**2.2 荧光定量 PCR 扩增曲线与溶解曲线** 实时荧光定量 PCR 是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量, 并据此推断目的基因的初始量。目的基因与 GAPDH 定量测定使用的是 SYBR Green 染料, 其扩增曲线呈“S”型, 说明用相应引物通过荧光定量 PCR 测定目的及管家基因的敏感性好, 其横坐标为 Ct 值, 纵坐标为荧光信号值。融解曲线如图 2, 未见杂峰, 也未出现主峰的异常增宽, 同时融解曲线主峰对应的  $T_m$  值与扩增产物的理论  $T_m$  相近, 提示目的序列扩增的特异性较高 (图 2)。

**2.3 各组织不同时期胰岛素 mRNA 的表达水平**

**2.3.1 灌糖组各组织不同时期胰岛素 mRNA 的表达水平** 时间因素与对照组十二指肠、对照组胰腺 mRNA 的表达均无显著性差异 ( $F=0.231, 0.143; P > 0.05$ )。各实验组不同时刻, 与对照组比较, 十二指肠 mRNA 的表达在 5、10、15 min 有显著差异 ( $t=11.105, 8.362, 9.854, P < 0.05$ ); 胰腺 mRNA 的表达在 5、10 min 有显著差异 ( $t=26.638, 22.784, P < 0.01$ ), 其余时间均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。



(a),(c): GAPDH 和胰岛素的扩增曲线; (b),(d): GAPDH 和胰岛素的溶解曲线

图2 GAPDH, insulin 扩增和溶解曲线图

Fig 2 Amplification and melting curve of GAPDH and insulin

表1 灌糖组各组织不同时间胰岛素 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab1 Insulin mRNA expression levels of each organizations of different time points in pour glucose group of rat( $\bar{x} \pm s$ )

观察时间	对照组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	实验组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	对照组胰腺 ( $\times 10^0$ )	实验组胰腺 ( $\times 10^0$ )	F	P
0 min	38.74±9.06	57.56±18.77	1.03±0.16	1.09±0.14	118.748	0.000
5 min	39.79±2.40	881.34±131.24*	1.06±0.085	160.18±10.35**	715.898	0.000
10 min	44.78±8.22	55 825.96±11 554.74*	1.09±0.13	49.92±3.70**	539.258	0.000
15 min	41.28±3.46	680.21±112.26*	1.07±0.15	2.10±0.09	407.020	0.000
20 min	40.41±3.12	53.76±9.13	1.04±0.06	2.55±0.22	343.393	0.000
25 min	37.32±5.35	50.41±10.92	1.10±0.09	2.29±0.27	172.563	0.000
F	0.570	69.168	0.157	602.322		
P	0.722	0.000	0.947	0.000		

实验组与对照组相比 \*\* $P<0.01$ , 实验组与对照组相比 \* $P<0.05$

2.3.2 灌脂组各组织不同时期的胰岛素 mRNA 水平 时间因素与对照组十二指肠、对照组胰腺 mRNA 的表达均无显著性差异 ( $F=0.247, 0.135, P>0.05$ )。各实验组内不同时刻, 与对照组比较, 十二指肠 mRNA 的表达在 10 min 有显著差异 ( $t=10.616, P<0.01$ ); 胰腺 mRNA 的表达在 5、10 min 有显著差异 ( $t=14.653, 19.180, P$  均  $<0.01$ ), 其余时间均无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 见表 2。

2.3.3 灌蛋白组各组织不同时期胰岛素 mRNA 的表达水平 时间因素与对照组十二指肠、对照组胰腺 mRNA 的表达均无显著性差异 ( $F=0.247, 0.135, P>0.05$ )。各实验组内不同时刻, 与对照组比较, 十二

指肠 mRNA 的表达在 10 min 有显著差异 ( $t=2.545, P<0.05$ ); 胰腺 mRNA 的表达在 5、10 min 有显著差异 ( $t=6.845, 15.962, P<0.01$ ), 其余时间均无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 见表 3。

表2 灌脂组各组织不同时间的胰岛素 mRNA 水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Insulin mRNA expression levels of each organizations of different time points in intragastric oil suspension group( $\bar{x} \pm s$ )

观察时间	对照组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	实验组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	对照组胰腺 ( $\times 10^0$ )	实验组胰腺 ( $\times 10^0$ )	F	P
0 min	36.34±4.10	50.58±15.42	1.03±0.10	1.10±0.17	564.476	0.000
5 min	30.64±7.29	781.95±89.50	1.06±0.25	185.68±30.86**	216.367	0.000
10 min	42.55±8.49	78 662.81±18 139.95**	1.09±0.18	46.92±5.85**	375.132	0.000
15 min	46.58±7.34	789.15±106.00	1.07±0.07	2.94±1.68	282.419	0.000
20 min	42.61±5.47	54.66±19.89	1.04±0.07	6.04±3.99	12.624	0.000
25 min	41.32±10.19	51.51±10.56	1.10±0.25	2.29±0.85	36.133	0.000
F	0.343	111.837	0.135	191.314		
P	0.833	0.000	0.983	0.000		

实验组与对照组相比 \*\* $P<0.01$

表3 灌蛋白组各组织不同时间胰岛素 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Insulin mRNA expression levels of each organizations of different time points in gavage group of bovine serum albumin solution( $\bar{x} \pm s$ )

观察时间	对照组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	实验组小肠 ( $\times 10^{-5}$ )	对照组胰腺 ( $\times 10^0$ )	实验组胰腺 ( $\times 10^0$ )	F	P
0 min	36.34±4.10	37.54±16.18	1.03±0.10	1.05±0.12	338.590	0.000
5 min	30.64±7.29	8 100.97±1 205.05	1.06±0.25	190.41±57.75**	47.213	0.000
10 min	42.55±8.49	37 940.04±8 901.12**	1.09±0.18	43.19±6.46*	263.622	0.000
15 min	46.58±7.34	8 609.41±1 234.43	1.07±0.07	5.86±1.25	118.878	0.000
20 min	42.61±5.47	89.73±7.12	1.04±0.07	1.33±0.23	210.173	0.000
25 min	41.32±10.19	52.28±17.17	1.10±0.25	1.26±0.18	118.543	0.000
F	0.343	5.796	0.135	43.989		
P	0.843	0.001	0.983	0.000		

实验组与对照组相比 \*\* $P<0.01$ , 实验组与对照组相比 \* $P<0.05$

2.4 胰腺与十二指肠组织中胰岛素 mRNA 的表达规律 健康空腹大鼠胰腺组织中的胰岛素表达水平在灌胃后 0 min 最低, 灌胃后迅速升高, 在灌胃 5 min 后达到高峰, 之后下降; 十二指肠中胰岛素表达水平在灌胃后 0 min 时也最低, 灌胃后先升高, 在灌胃 10 min 后达到高峰, 之后下降。

2.5 胰腺与十二指肠胰岛素表达量的比较 十二指肠组织在灌糖、灌脂、灌蛋白刺激后有胰岛素的表达, 其中十二指肠分泌的胰岛素远远低于胰腺组织 ( $P<0.01$ )。灌胃后胰腺和十二指肠胰岛素的表达水平呈动态表化, 且十二指肠胰岛素的表达高峰晚于胰腺。

### 3 讨论

早在 1932 年, 拉贝尔 (La Barre) 就曾经提出过,

肠道中存在一种可以影响血糖的激素,并为之命名为肠促胰岛素分泌激素。后续研究确定了特殊物质的身份,它们是回肠 L 细胞合成分泌的胰高糖素样肽-1(GLP-1)<sup>[10]</sup>和空肠 K 细胞合成分泌葡萄糖依赖性促胰岛素分泌多肽(GIP)<sup>[11]</sup>。现在 GLP-1<sup>[12]</sup>成为一种理想的独立于以往降糖药物作用机制的全新研发方向,但是没有证据证实不存在其他类胰岛素作用的物质。

糖尿病外科领域权威专家纽约教会医院的 Rubino 博士<sup>[13]</sup>研究发现,小肠可能在糖尿病发病机制中有重要的作用。现今糖尿病患者不推荐进行手术治疗,减肥手术也只用于严重肥胖的患者。Rubino 博士认为,胃肠通路手术不仅用于肥胖患者,对糖尿病患者也将产生显著疗效。新近国外学者在手术治疗肥胖症患者时,也发现大量胃旁路手术后,即切除胃小部和十二指肠大部分并将残端吻合后,糖尿病患者胰岛素、GIP、GLP-1 分泌均增加,糖尿病症状好转,而非糖尿病患者经该手术后则出现低血糖症状,这与 Rubino 博士的推测相符。可见小肠通过在机体内分泌胰岛素进而调整血糖这一过程中,起到了一定的作用。

还有文献证实大鼠十二指肠壁存在朗格罕氏胰岛外小岛,小岛的由胰岛素细胞组成,高血糖素、生长激素抑制激素和胰腺多肽细胞存在于外围。这些内分泌细胞的形态学特点提示他们存在高分泌活动,这可能会对维护体内血糖平衡,特别是在养分的吸收中起重要作用<sup>[14]</sup>。

我们根据上述这些研究和对糖尿病发病机制<sup>[15-17]</sup>的深入研究,推测除胰岛  $\beta$  细胞外可能还存在分泌胰岛素的组织,提出了小肠组织可能具有分泌胰岛素功能的设想,并做了大量的工作。本实验在未给予任何基因修饰的基础上研究异源性胰岛素的存在及其作用。反转录普通 PCR 在大鼠十二指肠中扩增出胰岛素基因片段(经测序证实与胰岛素基因序列完全一致);利用实时荧光定量 PCR 可检测出健康空腹大鼠胰腺组织中的胰岛素表达水平在灌胃后 0 min 最低,灌胃后迅速升高,在灌胃 5 min 后达到高峰,之后下降;十二指肠中胰岛素表达水平在灌胃后 0 min 也最低,灌胃后先升高,在灌胃 10 min 后达到高峰,之后下降;可以得出十二指肠胰岛素 mRNA 相对表达量的峰值晚于胰腺出现,其中十二指肠分泌的胰岛素远远低于胰腺组织 ( $P<0.01$ ),二者在饮食后不同时刻出现胰岛素分泌的高峰,从而发挥降血糖作用。

通过本次实验,结合已有研究可推测十二指肠

中不仅存在肠促胰岛素和抗肠促胰岛素,而且也分泌胰岛素,我们将其称为肠源胰岛素。健康人肠促胰岛素、肠源胰岛素和抗肠促胰岛素因子处于平衡,保持血糖水平的正常,而在某些患者体内十二指肠和回肠可能产生过多的抗肠促胰岛素,从而减少肠促胰岛素、肠源胰岛素的分泌并阻断胰岛素的作用,最后导致糖尿病的发生。

#### 参考文献:

- [1] Ostenson C G. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview[J]. *Acta Physiol Scand*, 2001, 171(3): 241
- [2] Lenhard J M, Gottschalk W K. Preclinical developments in type 2 diabetes[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(9): 1199
- [3] Muoio D M, Newgard C B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 193
- [4] Layden B T, Durai V, Newman M V, et al. Regulation of pancreatic islet gene expression in mouse islets by pregnancy[J]. *Endocrinol*, 2010, 207(3): 265
- [5] Chen G, Liu C, Xue Y, et al. Molecular mechanism of pancreatic  $\beta$ -cell adaptive proliferation: studies during pregnancy in rats and in vitro[J]. *Endocrine*, 2011, 39(2): 118
- [6] Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, et al. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells[J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2505
- [7] Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, et al. Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin[J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1398
- [8] Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(9): 5034
- [9] Liu F, Qifan H, Qiu J, et al. A paradox: Insulin inhibits expression and secretion of resistin which induces insulin resistance[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(1): 95
- [10] Drucker D J. Minireview: the glucagon-like peptides[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 521
- [11] Parkes D G, Pittner R, Jodka C, et al. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro [J]. *Metabolism*, 2001, 50(5): 583
- [12] 赵学敏,高继东,张惠莉. GLP-1 受体激动剂治疗 2 型糖尿病的研究进展[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(21): 17
- [13] Rubino F. Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis[J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(2): S290
- [14] Bendayan M, Park I S. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat[J]. *Diabetologia*, 1991, 34(8): 604
- [15] Tilg H, Moschen A R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance[J]. *Mol Med*, 2008, 14(5): 222
- [16] Layden B T, Durai V, Newman M V, et al. Regulation of pancreatic islet gene expression in mouse islets by pregnancy[J]. *Endocrinol*, 2010, 207(3): 265
- [17] 毛佳,杨涛. I 型糖尿病发病机制的研究进展[J]. *江苏医药*, 2013, 39(3): 342

(2013-10-25 收稿)