

文章编号 1006-8147(2019)05-0455-04

论 著

小鼠小肠不同部位细胞中的胰岛素分泌水平

周翰驰, 陈皓, 张瑞, 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:探究小鼠小肠细胞是否能够合成胰岛素以及十二指肠、空肠、回肠分泌胰岛素的水平是否有差异。方法:以健康 C57BL/6J 小鼠的小肠为研究对象,将小肠分为十二指肠、空肠、回肠 3 部分,通过电子扫描显微镜、免疫荧光、PCR 和 Western blot 对小肠中的胰岛素进行检测。结果:免疫荧光检测结果显示,在小鼠小肠的肠绒毛及肠隐窝有胰岛素、PDX1 及 ICA-512 的表达。电子扫描显微镜观察发现小肠隐窝附近的细胞内有类似胰岛素的分泌颗粒。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,小肠中有胰岛素 mRNA 及蛋白质表达。结论:小肠中确实存在胰岛素表达,其中空肠的胰岛素表达水平最高,十二指肠和回肠的表达水平稍低。

关键词 小肠;胰岛素;小鼠;胰外胰岛素

中图分类号 R587.1

文献标志码 A

Insulin secretion levels in cells of different parts of mouse small intestine

ZHOU Han-chi, CHEN Hao, ZHANG Rui, GUO Gang

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

Abstract Objective: To investigate whether mouse intestine cells in mice can synthesize insulin and whether the levels of insulin secreted by duodenum, jejunum and ileum are different. **Methods:** We used the small intestine of healthy C57BL/6J mice as the research object. The small intestine was divided into three parts: duodenum, jejunum and ileum. The insulin was detected by scanning electron microscopy, immunofluorescence, PCR and western blot. **Results:** Immunofluorescence assay showed that insulin, PDX1 and ICA-512 were expressed in the intestinal villi and intestinal crypts of the small intestine. Electron scanning microscopy revealed that there were insulin-like secretory granules in the cells near the small intestine crypt. RT-PCR and western blot showed that insulin mRNA and protein were expressed in the small intestine. **Conclusion:** There is indeed insulin expression in the small intestine. Among them, the expression level of insulin in the jejunum is the highest, and the expression levels in the duodenum and ileum are slightly lower.

Key words small intestine; insulin; mouse; extra-pancreatic insulin

II 型糖尿病是世界范围内的主要公共卫生问题。对 370 个国家的 270 万人进行的多国健康调查分析表明,从 1980-2008 年,全世界 II 型糖尿病的患病率翻了一番^[1-2]。这种趋势将持续到 2025 年,并给每个国家的医疗保健系统带来沉重的财政负担^[3-4]。其病理生理学不仅涉及胰腺,还涉及到肝脏、骨骼肌、脂肪组织、胃肠道、脑和肾脏^[5]。国际糖尿病联合会的报告指出,到 2040 年,预计全球将有超过 6 000 万人患有糖尿病。2007 年,美国用于诊断和治疗糖尿病的花费达到 1 740 亿美元^[6]。

以往的观点认为,胰岛素由胰腺分泌,胰腺中主要的分泌细胞有 α 细胞和 β 细胞两种,前者主要分泌胰高血糖素,后者主要分泌胰岛素。近年来随着研究的进一步深入,人们发现在 2 型糖尿病的致病因素中, β 细胞去分化也占有一定的比例,并且在

一定情况下去分化的 β 细胞会分化为 α 细胞,进一步的破坏血糖平衡^[7];在这一过程中,PDX1 扮演着重要的角色。胰腺十二指肠同源框-1 蛋白(PDX1)是存在于胰腺 β 细胞中的含 282 个氨基酸的同源结构域转录因子。PDX-1 是 β 细胞中胰岛发育和胰岛素基因转录的关键调节剂,可以加强 β 细胞活性,减少 β 细胞凋亡,并且防止其去分化。PDX-1 在发育早期的所有细胞中均有表达,成年后主要限于胰腺和十二指肠。此外,还有研究指出经 PDX-1 处理的小肠上皮细胞(IEC-6)可以分化成为合成胰岛素的细胞^[8]。

有诸多研究表明胰腺外存在胰岛素或胰岛素类似物。有文章指出,通过 RT-PCR 和免疫组化实验,在胎鼠和乳鼠的大脑、肝脏、视网膜等组织中发现了前胰岛素原和胰岛素类似物^[9]。中枢神经系统中,也已经有研究证实下丘脑有胰岛素分泌^[10]。在 STZ 小鼠肝脏、脂肪、骨髓等组织中也发现了胰岛素 mRNA^[11]。

基金项目 天津市委重点项目资助(14JCZDJC33700)

作者简介 周翰驰(1992-),男,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:郭刚,E-mail:guogangtj@126.com。

在胚胎发育阶段,胰岛内分泌细胞和小肠上皮细胞有着共同的起源,这意味着小肠中可能有某些细胞具有分泌胰岛素的潜能。小肠可以分泌包括胰高血糖素在内的多种胰肽,但是一直以来少有证据能够证明小肠可以合成胰岛素。在我们的前期研究中发现,小肠含有胰腺细胞特异性的识别蛋白,该蛋白质为胰岛细胞抗原 512(ICA512)。ICA512 是一种受体型 PTP 样蛋白,含有跨膜区,细胞内 PTP 样结构域和一个胞外 N 端,定位于分泌颗粒,ICA-512 仅在胰岛细胞中表达并且参与调节分泌颗粒的胞吐作用。本研究选用未经处理的 C57BL/6J 小鼠,针对小肠不同部位,从基因和蛋白等水平来证明有胰岛素在小肠的细胞中合成。

1 材料与方法

1.1 动物材料 所有的实验用小鼠均购自北京华宝生物科技有限公司。小鼠在无特殊病原菌的动物房喂养,室温为恒温 23℃。适应 1 周后,选取健康的雄性 C57BL/6J 小鼠($n=5$)通过腹腔注射 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,然后处死,剪取十二指肠、空肠、回肠、胰腺。所有动物实验得到动物伦理和实验部门的批准,且按照天津医科大学委员会的要求进行。

1.2 免疫荧光检测 将动物组织用石蜡包埋,制成切片,二甲苯脱蜡,100%~70%浓度梯度乙醇脱水,Tris-EDTA 溶液抗原修复,室温下 Tirtan 处理 15 min,经 PBS 漂洗后,用牛奶封闭,分别用胰岛素抗体、PDX1 抗体、ICA-512 抗体 4℃孵育过夜,PBS 漂洗后,分别用 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗和 TRITC 标记的山羊抗兔二抗孵育,室温 1 h,用 DAPI 将细胞核染色,封片。在荧光显微镜下检测。

所用试剂如下:胰岛素抗体(1:1 000, ab6995, abcam, UK),PDX1 抗体(1:2 000, ab47267, abcam, UK),ICA-512 抗体(1:500, sc-130570, santa cruz, USA),FITC 标记的抗小鼠二抗(1:200, ZF-0312, ZSGB, Beijing, China),TRITC 标记的抗兔二抗(1:200, ZF-0316, ZSGB, Beijing, China)。

1.3 电子扫描显微镜检测 剪取一小段组织放入 2.5%戊二醛固定液中,经 PBS 漂洗后用 1%锇酸缓冲液固定,用浓度 50%~100%浓度梯度的丙酮脱水,再用 spurr 包埋剂进行包埋,待包埋完成后,切片在电子扫描显微镜下观察。

1.4 实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR) 用 TRIzol(9108, TaKaRa, Biotech, Japan)裂解小鼠组织,加入氯仿,4℃离心,13 000 r/min,取上清液,加等体积异丙醇,4℃离心,沉淀加 75%乙醇,漂洗离心,13 000 r/min,干

燥后,加入 20 μ L DEPC 水,即为组织 RNA。逆转录获得 cDNA(AT301-03, TransGen Biotech, Beijing, China)。RT-PCR(AQ131-04, TransGen Biotech, Beijing, China)检测内参 β -actin 以及胰岛素 mRNA 的表达量。

胰岛素引物序列:上游 5'-CTGGTGGG CATCCAGTAACC-3',下游 5'-ACACACCAGGTA-GAGAGCCT-3',产物长度 209bp。

β -actin 引物序列:上游 5'-CATTGCTGA CAGGATGCAGAAGG-3',下游 5'-TGCTGGAAG-GTGGACAGTGAGG-3',产物长度 138bp。

扩增条件:95℃预变性 1 min,然后依次为 94℃变性 10 s,58℃退火 15 s,72℃延伸 20 s,共 40 个循环。每次 PCR 反应至少重复 3 次。

1.5 Western 印迹分析 组织用 RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 分解,按组织:RIPA:PMSF=20 mg:100 μ L:1 μ L 的比例提取蛋白质,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)之后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Nitrocellulose Blotting Membranes, NC)上,用 5%的脱脂奶粉在室温下封闭 2 h,用胰岛素抗体 4℃孵育过夜,PBST 漂洗后,与 HRP 标记的抗兔二抗结合,室温 1 h,PBST 漂洗后,用 ECL 印迹检测使蛋白条带可视化,检测其表达量。

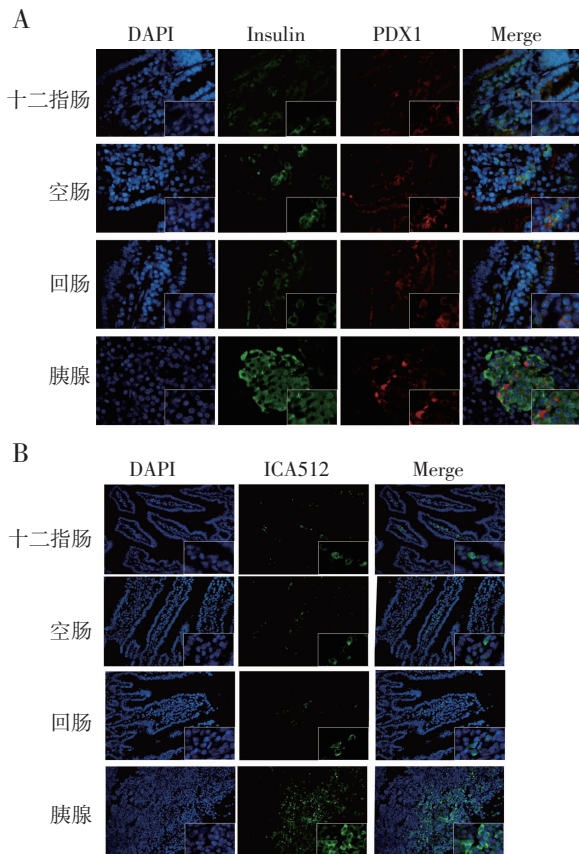
所用试剂如下:胰岛素抗体(1:2 000, 15848-1-AP, proteintech),GAPDH 抗体(1:5 000, AP0066, Bioworld Technology, Inc., USA),辣根过氧化物酶抗兔二抗(1:2 000, BS13278, Bioworld Technology, Inc., USA),ECL 印迹检测试剂(WBKLS0500, Millipore Corporation)。

2 结果

2.1 形态学检测发现小肠表达胰岛素 将小肠按照十二指肠、空肠、回肠分成 3 组,以胰腺作为阳性对照,分别检测其胰岛素及 PDX1 的表达。结果显示胰岛素及 PDX1 在部分细胞中同时存在(图 1A),十二指肠表达量略少于空肠和回肠,空肠和回肠表达量没有显著差异。同时笔者还发现在小肠中存在少量的 ICA-512(图 1B)。

电子扫描显微镜观察的结果显示,在十二指肠(图 2A),空肠(图 2B),回肠(图 2C)中都存在类似胰岛素的分泌颗粒,表达量上并无明显差异。

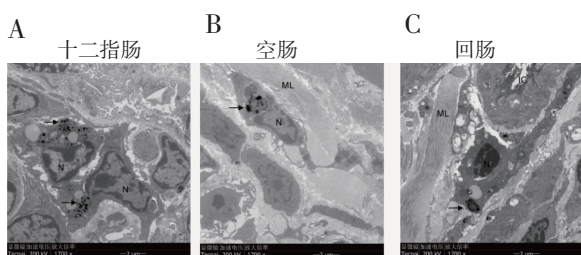
形态学的结果表明,小肠中的胰岛素存在于细胞内部,众所周知,胰岛素是作用在细胞表面胰岛素受体的一种蛋白质,胰岛素本身在完成生理作用的过程中不会进入细胞,所以可以认为,笔者检测到的胰岛素是由小肠细胞自身合成的,并非由胰岛 β 细胞合成再经血液转运而来。



A.在十二指肠、空肠、回肠及胰腺中检测到的胰岛素和PDX1,有部分细胞呈胰岛素、PDX1双阳性,放大倍数1000倍;B.小肠及胰腺中检测到的ICA-512,放大倍数400倍

图1 免疫荧光检测小肠中的胰岛素

Fig 1 Immunofluorescence detection of insulin in the small intestine

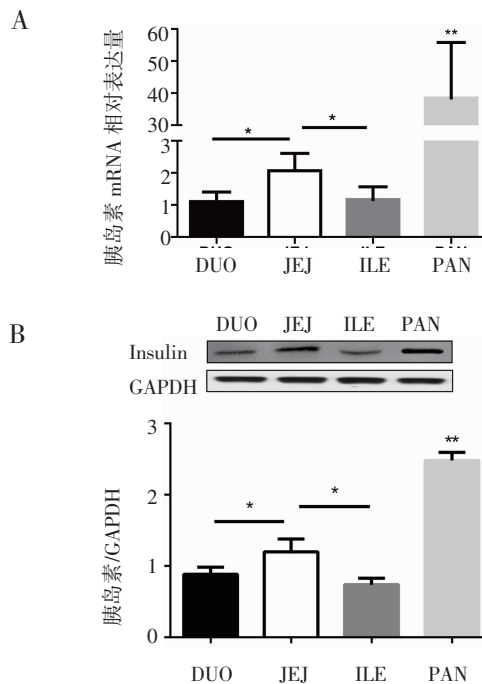


→所指为胰岛素分泌颗粒,N为细胞核,ML为肌肉层,IC为小肠隐窝

图2 电镜检测小肠中的胰岛素分泌颗粒

2.2 RT-PCR及western检测小肠胰岛素阳性 用 β -actin为内参,RT-PCR检测十二指肠、空肠、回肠和胰腺中胰岛素mRNA的相对表达量(图3A)。空肠与十二指肠和回肠的胰岛素相对表达量的差异具有统计学意义($P<0.05$),小肠组织与胰腺之间差异更为明显($P<0.01$)。通过Western blot对小肠中胰岛素表达量的检测得到了和RT-PCR相一致的结果(图3B),同样选取 β -actin作为内参,图中显示的是胰岛素在各个部位的相对表达量,其中空肠与十二指肠和回肠的表达量具有明显差异($P<0.05$)。

和RT-PCR结果一致,小肠中空肠的胰岛素表达量最高,十二指肠和回肠表达量没有显著差别。取样时小鼠空腹8h,血糖水平为7.3 mol/L,8.5 mol/L,5.8 mol/L。



A.小肠和胰腺中胰岛素mRNA的相对表达量,DUO为十二指肠,JEJ为空肠,ILE为回肠,PAN为胰腺;B.小肠和胰腺中胰岛素蛋白的相对表达量,*表示两组间差异 $P<0.05$,**表示该组与各组间差异均符合 $P<0.01$,未标注的为两组间差异不具有统计学意义

图3 RT-PCR及WB分析小肠中胰岛素mRNA和蛋白质的相对表达量

Fig 3 RT-PCR and WB analysis of relative expressions of insulin mRNA and protein in the small intestine

3 讨论

I型糖尿病致病原因是胰岛 β 细胞功能损坏,II型糖尿病的病因除 β 细胞功能损害外还有胰岛素抵抗等等。目前治疗糖尿病的手段主要有口服降糖药物、胰岛素注射、胰岛素泵等,无论哪种治疗方法都需要长期用药,不但对患者身心有所危害也对患者经济条件有一定挑战。笔者急需找到新的治疗方法来解决日趋严峻的糖尿病防治问题。目前,胰岛细胞移植疗法和干细胞培育疗法获得了一定的关注,但术后的免疫排斥反应以及细胞来源的缺乏造成了很大阻碍。本研究证明小肠具有生物合成胰岛素的功能,可能为未来糖尿病的防治提供一个新思路。

长久以来,有许多研究和报道显示,体内存在非胰腺胰岛素或称胰外胰岛素。在小肠中发现了有前胰岛素原和胰岛素mRNA存在^[9,12]。短期禁食会促使小鼠的下丘脑表达胰岛素^[10]。在糖尿病小鼠的

肝脏、脂肪、脾脏、骨髓及胸腺中发现了胰岛素原的 mRNA 和蛋白质^[1]。笔者可以看到在糖尿病或禁食等非正常状态下,机体很多组织都具有一定的表达胰岛素的能力。而在正常的健康状态下,仅有小肠检测出了胰岛素基因转录阳性。这说明在正常的身体能量代谢过程中,小肠胰岛素参与了某些调控能量代谢的过程。此外,我们的前期研究发现,将 8 周龄 Wister 大鼠禁食 24 h, 分别灌胃 50%葡萄糖溶液、牛血清白蛋白溶液、油脂悬液,结果显示小肠部分存在动态变化的胰岛素 mRNA,且与胰腺表达高峰时间不同^[13]。

在探索小肠是否能成为潜在的胰岛素分泌的器官时,一种蛋白质 GLP-1 引起了极大的注意。GLP-1 是一种胰高血糖素基因编码的由回肠 L 细胞分泌的肠促激素,其在体内的主要活性形式为 GLP-1₇₋₃₇ 和 GLP-1₇₋₃₆,主要作用在胰岛 β 细胞,具有防止 β 细胞凋亡,促进胰岛素分泌等作用^[14-15]。GLP-1₁₋₃₇ 在体内的作用尚不明确,但研究发现其可以诱导小肠上皮细胞分泌胰岛素^[16],还可以增加小鼠的葡萄糖耐受性^[17]。有团队进一步证明,GLP-1 可以诱导大鼠小肠隐窝上皮细胞 (IEC-6) 表达胰岛素,此外,给大鼠口服可以表达 GLP-1₁₋₃₇ 的工程菌制片,可以有效增加大鼠的糖耐量^[18]。

小肠胰岛素的作用虽然尚不明确,但我们根据现有文献资料猜测其可能具有以下两种功能:一是小肠胰岛素的分泌受葡萄糖含量的影响,同时回肠 L 细胞分泌 GLP-1 的过程受到胰岛素含量和血糖水平的调控^[14-15],小肠胰岛素可以通过旁分泌或自分泌结合血糖水平来调节 GLP-1 的表达,进一步影响胰岛 β 细胞生成胰岛素。二是小肠胰岛素可能具有调节局部血糖的作用,尤其在进食后及肠道吸收葡萄糖的过程中,通过小肠分泌的胰岛素,防止由于集中吸收葡萄糖而使血糖快速上升造成危害。

参考文献:

- [1] Danaei G, Finucane M M, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants[J]. *Lancet*, 2011, 378(9785):31
- [2] Kim S J, Jee S H, Nam J M, et al. Do early onset and pack-years of smoking increase risk of type II diabetes[J]. *BMC Public Health*, 2014,14(1):178
- [3] King H, Aubert R E, Herman W H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections[J]. *Diabetes Care* 1998, 21(9):1414
- [4] Mokdad A H, Ford E S, Bowman B A, et al. The continuing increase of diabetes in the US[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(2): 412
- [5] Cornell S. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11:621
- [6] Polonsky K S. The past 200 years in diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(14):1332
- [7] Talchai C, Xuan S H, Lin H V, et al. Pancreatic beta Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic beta Cell Failure[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1223
- [8] 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
- [9] Kendzierski K S, Pansky B, Budd G C, et al. Evidence for biosynthesis of preproinsulin in gut of rat[J]. *Endocrine*, 2000,13(3): 353
- [10] Dakic T B, Jevdjovic T V, Peric M I, et al. Short-term fasting promotes insulin expression in rat hypothalamus[J]. *Eur J Neurosci*, 2017,46(1):1730
- [11] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, et al. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(8): 2458
- [12] Bell G D, Reddy S, Sun X E, et al. Distribution of insulin mRNA transcripts within the human body[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014,451(3): 425
- [13] 甘文学,张瑞,张欣,等.大鼠小肠分泌胰岛素基因水平研究[J].*天津医科大学学报*, 2014, 20(2): 98
- [14] Holst J J. The physiology of glucagon-like peptide 1[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1409
- [15] Baggio L L, Drucker D J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP[J]. *Gastroenterology*, 2007,132(6): 2131
- [16] 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
- [17] Zhao L, Ye H, Li D, et al. Glucagon-like peptide-1 (1-37) can enhance blood glucose homeostasis in mice[J]. *Regul Pept*, 2012, 178(1/3):1
- [18] Duan F F, Liu J H, March J C. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into Glucose-Responsive Insulin-Secreting cells for the treatment of diabetes[J]. *Diabetes*, 2015, 64(5): 1794

(2018-11-16 收稿)