

血管紧张素-(1-7)对胰岛素分泌细胞株 NIT-1 增殖的影响

王晓云, 徐明彤*, 林秀红, 宛彦, 任萌, 李焱, 严励
(中山大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨血管紧张素[Ang-(1-7)]对小鼠胰岛素分泌细胞株 NIT-1 细胞增殖的影响。【方法】NIT-1 细胞按以下分组分别处理 24 h, 采用 CCK-8 比色法检测细胞增殖。(1)11.1、25.0、30.0、35.0 和 40.0 mmol/L 葡萄糖液, 35.0 mmol/L 甘露醇分别处理 24 h; (2)0、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L Ang-(1-7)分别处理 24 h; (3)高糖(HG, 35.0 mmol/L)、HG+Ang-(1-7)(10^{-5} mol/L)、HG+Ang-(1-7)+Mas 受体拮抗剂(A-779, 10^{-5} mol/L)和 HG+A-779 组。【结果】(1)较 11.1 mmol/L 组, 葡萄糖浓度为 35.0 和 40.0 mmol/L 时, NIT-1 细胞的增殖明显减低 (1.02 ± 0.07 vs 1.21 ± 0.10 ; 0.90 ± 0.05 vs 1.21 ± 0.10 , $P < 0.05$)。 (2)在 11.1 mmol/L 葡萄糖培养条件下, $10^{-7} \sim 10^{-4}$ mol/L 之间的 Ang-(1-7)不影响 NIT-1 细胞的增殖。(3)与 HG 组相比, HG+Ang-(1-7)组细胞的增殖率明显增加(1.44 ± 0.24 vs 1.14 ± 0.07 , $P < 0.05$), 加入 A-779 共同孵育可逆转 Ang-(1-7)的促增殖效应(1.20 ± 0.02 vs 1.44 ± 0.24 , $P < 0.05$)。【结论】Ang-(1-7)通过 Mas 受体拮抗高糖对 NIT-1 细胞增殖的抑制作用。

关键词:血管紧张素-(1-7); 胰岛 β 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R587 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)04-0517-04

Effect of Angiotensin-(1-7) on Proliferation of Insulin-secreting Cell Line NIT-1

WANG Xiao-yun, XU Ming-tong*, LIN Xiu-hong, WAN Yan, REN Meng, LI Yan, YAN Li

(Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate whether Angiotensin-(1-7) can affect the proliferation of mouse insulin-secreting cell line NIT-1. 【Methods】 NIT-1 cells were divided into different groups as follows and cell counting Kit-8 method (CCK-8) was performed to detect the proliferation of NIT-1 at different groups separately: (1) Glucose at concentration of 11.1, 25.0, 30.0, 35.0, and 40.0 mmol/L, mannitol at concentration of 35 mmol/L for 24 h; (2) Ang-(1-7) at concentrations of 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , and 10^{-4} mol/L for 24 h; (3) High glucose(HG), HG+Ang-(1-7), HG+Ang-(1-7)+Mas receptor inhibitor(A-779), HG+A-779. 【Results】 (1) Compared with the 11.1 mmol/L group, the cell proliferation were inhibited in the 35.0 mmol/L and 40.0 mmol/L groups (1.02 ± 0.07 vs 1.21 ± 0.10 ; 0.90 ± 0.05 vs 1.21 ± 0.10 , $P < 0.05$). (2) No significant difference of the proliferation in NIT-1 cells was found between Ang-(1-7) treatment groups ($10^{-7} \sim 10^{-4}$ mol/L). (3) Compared to the HG group, the proliferation of the HG+Ang-(1-7) group was higher (1.44 ± 0.07 vs 1.14 ± 0.24 , $P < 0.05$); Compared to the HG+Ang-(1-7) group, the proliferation of the HG+Ang-(1-7)+A-779 group was decreased (1.44 ± 0.24 vs 1.20 ± 0.02 , $P < 0.05$). 【Conclusion】 By binding to Mas receptor, Ang-(1-7) could reverse the inhibitory effect of high glucose on proliferation of NIT-1 cells.

Key words: angiotensin-(1-7); islet β cell; cell proliferation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4):517-520, COV3]

胰岛 β 细胞缺陷导致胰岛素分泌不足是 2 型糖尿病发生发展的重要病理生理机制^[1]。多种因素参与胰岛损伤, 包括糖毒性、脂毒性、胰淀粉样肽沉积以及炎症因子等。近年研究显示肾素血管

紧张素系统(Renin angiotensin system, RAS)与胰岛 β 细胞功能关系密切, 课题组前期研究发现血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 可通过影响胰岛素信号通路而抑制胰岛素合成分泌^[2]。血管紧

收稿日期: 2013-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(81270915), 广东省科技计划(2009B030801017)

作者简介: 王晓云, 硕士, 研究方向: 糖尿病发病机制, E-mail: xmxiaoyun@hotmail.com; * 通信作者: 徐明彤, 博士, 主任医师, 研究方向: 糖尿病发病机制, E-mail: xumingt@21cn.com

张素-(1-7) (Angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)) 是 RAS 的另一重要活性产物,主要通过 Mas 受体起作用,在多处靶点呈现与 Ang II 相反的生理效应^[3-5]。课题组前期研究显示在胰岛 β 细胞,Ang-(1-7) 可拮抗 Ang II 对胰岛素信号通路的抑制作用^[6]。Ang-(1-7) 是否影响胰岛 β 细胞的生长,如增殖,尚未明确。本研究拟采用小鼠胰岛素分泌细胞株 NIT-1 细胞建立体外糖尿病细胞模型,探讨 Ang-(1-7) 对胰岛 β 细胞增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验细胞与试剂

小鼠胰岛素分泌细胞株 NIT-1 细胞为本研究室保存。Ang-(1-7) 购自 Sigma 公司(美国);Mas 受体拮抗剂 A-779(SP2602a) 购自 Abgent 公司(美国);细胞增殖活性测试试剂盒(cell counting kit-8 试剂盒) 购自 Dojindo Laboratories 公司(日本),其余试剂均为分析纯级。

1.2 细胞培养

NIT-1 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM(葡萄糖浓度 11.1 mmol/L) 培养基在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下培养,取对数生长期细胞进行以下实验。

1.3 试剂制备

用蒸馏水溶解 Ang-(1-7) 及 A-779; 用 450 g/L 的葡萄糖液及低糖培养基制备不同葡萄糖浓度培养基。

1.4 实验分组

1.4.1 不同浓度葡萄糖对 NIT-1 细胞增殖的影响

研究包括不同浓度梯度葡萄糖溶液干预组,终葡萄糖浓度分别为 11.1、25.0、30.0、35.0 和 40.0 mmol/L; 同时采用浓度为 35.0 mmol/L 甘露醇干预作为高渗对照组。各组均干预 24 h。相同实验条件下重复 4 次。

1.4.2 不同浓度 Ang-(1-7) 对 NIT-1 细胞增殖的影响

研究分为 6 组: 对照组、10⁻⁴ mol/L Ang-(1-7) 组、10⁻⁵ mol/L Ang-(1-7) 组、10⁻⁶ mol/L Ang-(1-7) 组和 10⁻⁷ mol/L Ang-(1-7) 组。各组葡萄糖浓度均为 11.1 mmol/L。各组 Ang-(1-7) 均干预 24 h, 重复 4 次。

1.4.3 Ang-(1-7) 对高糖导致的 NIT-1 细胞增殖抑制的影响

研究分为 4 组: 高糖(HG)组、HG+

Ang-(1-7) 组、HG+Ang-(1-7)+A-779 组和 HG+A-779 组。研究中葡萄糖终浓度为 35.0 mmol/L; Ang-(1-7) 终浓度为 10⁻⁵ mol/L; A-779 终浓度为 10⁻⁵ mol/L。干预顺序为 A-779、Ang-(1-7)、高糖, 每种干预间隔 30 min, 最后共同孵育 24 h, 重复 4 次。

1.5 CCK-8 比色法检测细胞增殖

采用 CCK-8 比色法检测 NIT-1 细胞的增殖情况。取对数生长期的细胞消化、计数,按每孔 1 × 10⁴ cells 铺于 96 孔板中,培养 24 h 后,无血清培养基饥饿细胞 24 h,按上述分组干预细胞。孵育 24 h 后去培养基,用无血清培养基配置 10% CCK-8 检测液,每孔加入 100 μ L, 37 °C、5%CO₂ 温箱中孵育 3.5 h, 酶标仪用 450 nm 波长检测吸光度。吸光度值与细胞数目成正比,用 450 nm 波长的吸光度值(A450 nm) 表示细胞增殖情况。

1.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差表示,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 不同浓度葡萄糖对 NIT-1 细胞的增殖的影响

予不同浓度葡萄糖干预 NIT-1 细胞,结果显示与 11.1 mmol/L 组相比,25.0 mmol/L 组细胞增殖明显增加(1.62 \pm 0.15 vs 1.21 \pm 0.10, $P < 0.05$), 35.0 mmol/L 组和 40.0 mmol/L 组细胞增殖则明显减低,差异均有统计学意义(1.02 \pm 0.07 vs 1.21 \pm 0.10, 0.90 \pm 0.05 vs 1.21 \pm 0.10, 均为 $P < 0.05$)。30.0 mmol/L 组与 11.1 mmol/L 组之间细胞增殖差异无统计学意义。高渗对照组与 11.1 mmol/L 组之间细胞增殖的差异亦无统计学意义,说明高浓度葡萄糖对细胞增殖影响并非来自高渗作用。提示升高的葡萄糖浓度对 NIT-1 细胞增殖具有双向影响,较最适合细胞生长葡萄糖浓度 2 倍左右升高的葡萄糖浓度对细胞增殖具有促进作用,而当葡萄糖浓度 ≥ 35.0 mmol/L 时则可抑制细胞增殖(图 1)。

2.2 不同浓度 Ang-(1-7) 对 NIT-1 细胞增殖的影响

如图 2 所示,在葡萄糖浓度为 11.1 mmol/L 培

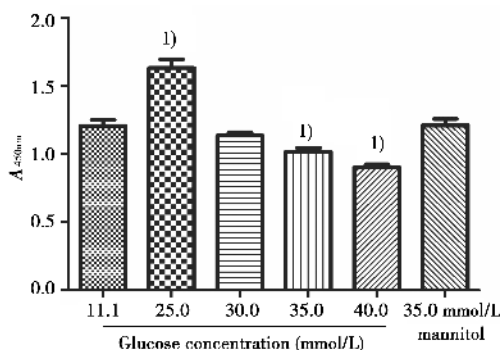


图1 不同浓度葡萄糖对 NIT-1 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of different concentration of glucose on proliferation of NIT-1 cells

1) $P < 0.05$ vs 11.1 mmol/L glucose group, $n = 4$.

养条件下, Ang-(1-7) 浓度在 10^{-7} mol/L 到 10^{-4} mol/L 之间时, NIT-1 细胞的增殖与对照组之间的差异无统计学意义。

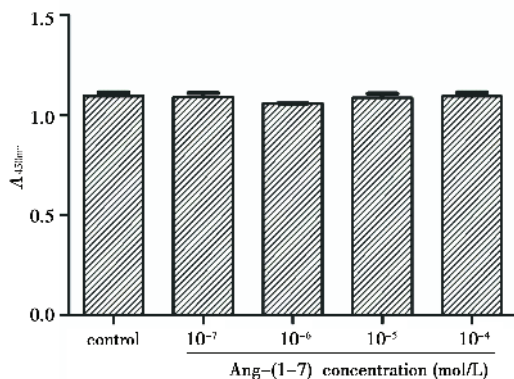


图2 不同浓度 Ang-(1-7)对 NIT-1 细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of different concentration of angiotensin-(1-7) on proliferation of NIT-1 cells

2.3 Ang-(1-7) 对高糖导致的 NIT-1 细胞增殖抑制的影响

采用 35.0 mmol/L 的葡萄糖溶液培养 NIT-1 细胞,建立细胞增殖受抑制的模型,探讨 Ang-(1-7)对高糖抑制 NIT-1 细胞增殖的影响,结果显示:与 HG 组比较, HG+Ang-(1-7)组细胞增殖显著增高($P < 0.05$), HG+Ang-(1-7)+A-779 组、HG+A-779 组差异均无统计学意义。与 HG+Ang-(1-7)组比较, HG+Ang-(1-7)+A-779 组、HG+A-779 组细胞增殖均明显减低($P < 0.05$)。HG+Ang-(1-7)+A-779 组与 HG+A-779 组细胞增殖的差异无统计学意义(表 1)。

表 1 Ang-(1-7)对高糖导致的 NIT-1 细胞增殖抑制的影响

Table 1 Effect of Ang-(1-7) on inhibition of NIT-1 cells proliferation induced by high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Group	A _{450nm}
HG	1.14 ± 0.07
HG+ Ang-(1-7)	1.44 ± 0.24 ¹⁾
HG+Ang-(1-7)+ A-779	1.20 ± 0.02 ²⁾
HG+ A-779	1.18 ± 0.07 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs HG; 2) $P < 0.05$ vs HG+Ang-(1-7)

3 讨论

胰岛功能受损所致的胰岛素分泌不足是 2 型糖尿病发生发展的重要病理生理机制。胰岛 β 细胞增殖受抑导致的 β 细胞数量明显减少是 β 细胞功能受损的重要机制之一^[7]。本研究采用小鼠胰岛素分泌细胞株 NIT-1 细胞,予不同浓度的葡萄糖溶液处理,应用 CCK-8 法检测细胞增殖,结果显示葡萄糖浓度对 NIT-1 细胞增殖存在双向影响,轻度升高的葡萄糖浓度具有促进作用,较高浓度 (≥ 35.0 mmol/L) 的葡萄糖溶液则抑制细胞增殖。血糖升高是胰岛 β 细胞代偿性数量增多的重要刺激因素^[8],胰岛 β 细胞通过肥大、数量增多和功能增强来促进胰岛素分泌,维持正常血糖。另一方面长期高糖对胰岛 β 细胞有抑制细胞增殖作用^[9]。Wei 等^[10]的研究显示葡萄糖浓度在 3~15 mmol/L 之间时,随着糖浓度增加,MIN6 细胞增殖增加;而相比糖浓度为 11 mmol/L 组,糖浓度为 40 mmol/L 时细胞增殖明显下降。本研究不同浓度葡萄糖对小鼠胰岛素分泌细胞 NIT-1 的影响符合体内病理生理的改变,并建立高浓度葡萄糖溶液致 NIT-1 细胞增殖抑制的体外细胞模型。

Ang-(1-7) 主要由 Ang II 在肾素血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme2, ACE2) 作用下生成,部分由中性肽链内切酶和羧脯酰肽链内切酶水解 Ang I 生成,对 RAS 起负调节作用,包括降压、促进血管舒张、利尿、促钠排泄、抗纤维化、抗血栓形成等^[11]。晚近研究显示 Ang-(1-7)-Mas 通路在维持机体正常糖代谢中起重要作用^[12-13]。敲除 Ang-(1-7) 受体 Mas 基因后 FVB 小鼠出现糖耐量异常^[14]。Santos 等^[13]在可分泌 Ang-(1-7) 融合蛋白的转基因大鼠中发现升高循环中 Ang-(1-

7) 浓度,大鼠糖耐量改善。进一步的研究提示 Ang-(1-7)可改善胰岛素敏感性进而调节糖代谢。Munoz 等^[12]给予果糖诱导的代谢综合征大鼠持续输注 Ang-(1-7),胰岛素作用靶器官肝脏、骨骼肌和脂肪组织中胰岛素信号分子(Akt、GSK-3 β 、AS160)磷酸化明显增加,大鼠的胰岛素抵抗显著改善,进而改善糖代谢;且该效应可被 Mas 受体拮抗剂 A-779 所阻断。课题组前期研究显示 Ang II 预处理小鼠胰岛素分泌细胞 NIT-1 后,胰岛素刺激的胰岛素受体 β 亚基酪氨酸磷酸化(IR- β -Tyr)、蛋白激酶丝氨酸磷酸化(Akt-Ser)表达显著降低;加入 Ang-(1-7)共同孵育可逆转 Ang II 对 Akt-Ser 表达的抑制,提示 Ang-(1-7)存在对胰岛 β 细胞的直接作用,在胰岛 β 细胞拮抗 Ang II 对胰岛素刺激的胰岛素信号通路的抑制作用,从而影响糖代谢^[6]。

本研究选择最适合 NIT-1 细胞生长的葡萄糖浓度、以不同浓度的 Ang-(1-7)处理细胞,显示在 10^{-7} mol/L 到 10^{-4} mol/L 浓度范围内 Ang-(1-7)无明显促细胞增殖效应,提示胰岛 β 细胞处于正常培养状态时,Ang-(1-7)无明显促增殖作用。而在建立高糖抑制 NIT-1 细胞增殖的模型的基础上,予 Ang-(1-7)预处理,则发现 NIT-1 细胞增殖明显增高,提示 Ang-(1-7)可以拮抗高糖对 NIT-1 细胞的增殖抑制作用。同时 Ang-(1-7)促进增殖的效应可被 A-779 所阻断,提示 Ang-(1-7)促进增殖的效应是通过结合 Mas 受体产生的。研究表明 Ang-(1-7)通过结合 Mas 受体可拮抗多种因素对组织细胞的损伤,促进细胞增殖,减少细胞凋亡。Rodgers 等^[15]的研究在 5 氟尿嘧啶致骨髓生长抑制小鼠模型皮下持续输注 Ang-(1-7),观察到造血祖细胞集落、白细胞和血小板数目均明显增多,提示 Ang-(1-7)可拮抗化疗药对骨髓细胞的增殖抑制。Bindom 等^[16]分别通过腺病毒转染 ACE2 基因至糖代谢正常的 db/m 小鼠和糖尿病动物模型 db/db 小鼠中,胰岛素及 PCNA 双染色免疫组化的方法检测 β 细胞增殖,显示 db/m 小鼠和 db/db 小鼠的胰岛 β 细胞增殖均明显增加。本研究从体外研究的角度,观察到 Ang-(1-7)结合 Mas 受体可拮抗高糖对胰岛 β 细胞的增殖抑制,进一步印证 Ang-(1-7)可保护胰岛 β 细胞免受一些损害因素的抑制。但本研究仅存在对胰岛 β 细胞不利因素时才显示 Ang-(1-7)对胰岛 β 细胞的保护

作用,与 Bindom 等的研究结果不尽相同。Bindom 的研究为体内研究,且在 Ang-(1-7)-Mas 轴的上游 ACE2 进行干预,而 ACE2 的产物并不是单一的 Ang-(1-7)。进一步在原代胰岛或其他动物模型进行 Ang-(1-7)的研究可望明确对 Ang-(1-7)对胰岛 β 细胞增殖的影响。Ang-(1-7)影响细胞增殖的机制目前尚未见报道,既往研究显示高糖可引起细胞内 Wnt、ERK 通路的改变,继而引起下游转录因子的改变,从而抑制细胞增殖,Ang-(1-7)结合 Mas 受体后,是否通过激活或阻断这些下游信号影响细胞增殖有待进一步研究。

综上所述,作为肾素血管紧张素系统的重要活性产物,Ang-(1-7)结合 G 蛋白偶联受体 Mas 受体,对 RAS 具有负性调节作用,在胰岛素靶器官具有改善胰岛素抵抗,改善糖代谢作用。本研究显示在胰岛素分泌细胞株中,Ang-(1-7)通过 Mas 受体可拮抗高糖对 NIT-1 细胞的增殖抑制作用,深入探讨 Ang-(1-7)对胰岛细胞功能的影响及相关机制将为保护胰岛细胞功能提供新的手段及治疗靶点。

参考文献:

- [1] Ma ZA, Zhao Z, Turk J. Mitochondrial dysfunction and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 703538.
- [2] 徐明彤,张莉,薛声能,等.血管紧张素 II 对小鼠胰岛素分泌细胞株 NIT-1 胰岛素信号通路的影响 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2011, 3(2): 142-146.
Xu MT, Zhang L, Xue SN, et al. Effects of angiotensin II on insulin signaling pathway in NIT-1 cells [J]. *Chin J Diabetes Mellitus*, 2011, 3(2): 142-146.
- [3] Mccollum LT, Gallagher PE, Ann TE. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling associated with upregulation of dual-specificity phosphatase 1 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(3): H801-H810.
- [4] Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(1): 25-53.
- [5] Liu HZ, Gao CY, Wang XQ, et al. [Angiotensin (1-7) attenuates left ventricular dysfunction and myocardial apoptosis on rat model of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy] [J]. *Chin J Cardiol*, 2012, 40(3): 219-224.
- [6] 柴佳妮,徐明彤,薛声能.血管紧张素 II、血管紧张素 II 受体拮抗剂对胰岛 β 细胞增殖的影响 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2011, 3(2): 142-146.