

胰岛素耐受的 HepG2 细胞模型建立

陈 秋* 夏永鹏 邱宗荫

(重庆医科大学药理学系, 重庆 400016)

摘要 采用高胰岛素体外诱导培养 HepG2 细胞, 建立胰岛素耐受的细胞模型。将 HepG2 细胞置于 5×10^{-7} mol/L 胰岛素培养液中 24 h, 采用 $^3\text{H-D}$ -葡萄糖掺入试验及残余 ^{125}I -胰岛素结合率测定等方法观察高胰岛素对 HepG2 细胞葡萄糖摄取率及其胰岛素受体数目和功能的影响。高胰岛素诱导培养的 HepG2 细胞葡萄糖掺入率及残余 ^{125}I -胰岛素结合率明显低于未用高胰岛素诱导的 HepG2 细胞(对照细胞)。将高胰岛素诱导培养的 HepG2 细胞置于不含胰岛素的培养液中 60 h, 其细胞葡萄糖摄取率仍明显低于对照细胞。将 HepG2 细胞置于 5×10^{-7} mol/L 胰岛素环境中 24 h, 该细胞对胰岛素的生物学效应产生抵抗, 其胰岛素抵抗状态可维持 60 h。

关键词 胰岛素耐受; 细胞模型; HepG2 细胞

胰岛素耐受是指机体靶组织对胰岛素的反应性低于正常的一种病理生理状态, 是包括 2 型糖尿病、高血压病、肥胖、动脉粥样硬化等常见临床疾病在内的共同危险因素^[1]。因此探讨 IR 发生的机制及改善胰岛素耐受药物的研究日益被人们所重视^[2]。肝脏及外周组织是胰岛素作用的靶组织, 是胰岛素耐受产生的主要部位, 但由于人体试验的局限性不便于对胰岛素耐受的发生机制进行深入研究, 且难以广泛开展。因此, 建立胰岛素耐受的细胞模型, 不仅可广泛用于在细胞水平探讨胰岛素耐受形成的机制和葡萄糖代谢障碍的病理生理学环节, 而且便于观察干预因素对胰岛素耐受的直接影响, 特别是更方便于筛选改善胰岛素耐受的药物。HepG2 细胞来源于肝细胞, 系一种表型与肝细胞极为相似的肝胚胎瘤细胞株, 保留了肝细胞的许多生物学特性。为此, 本实验拟模仿机体胰岛素耐受的发病机制及其病理学特点, 用生理及超生理浓度的胰岛素分别刺激 HepG2 细胞, 观察 HepG2 细胞表面胰岛素受体的数目及功能和葡萄糖摄取率的变化。以期探讨采用高浓度胰岛素体外诱导培养法建立与复制呈胰岛素耐受特点的 HepG2 细胞模型的可能性, 为筛选具有改善胰岛素耐受潜在疗效的中西药物提供一种简便可靠的胰岛素耐受细胞模型。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

DMEM 培养基、牛血清白蛋白、胰蛋白酶、

乙二醇四乙酸、小牛血清均系美国 Gibco BRL 公司产品, IV 型胶原酶、PMSF、HEPES 为美国 Sigma 公司产品, 基因工程人胰岛素系美国 Lilly 公司产品, $^3\text{H-D}$ -葡萄糖由中国原子能研究院提供, POP 和 POPOP(进口分装产品)由上海生化试剂供应站提供, 其余各种化学试剂均为市售分析纯。

1.2 实验仪器与设备

超净工作台(苏州空气技术有限公司, SW-CF-2FD 型)、离心机(上海医疗器械, 80-2 型)、CO₂ 恒温培养箱(美国 Shell, 2300 型)、DU 系列分光光度计(美国 Beckman)、LS 1801 液体闪烁仪(美国 Beckman)、FT-608 γ 计数仪等。

1.3 HepG2 细胞的培养

HepG2 肝癌细胞株由重庆医科大学超声工程研究所惠赠。细胞复苏后转入 100 ml 培养瓶中培养。HepG2 细胞为贴壁细胞, 当细胞长满后, 倾去培养基, 用 Hanks 缓冲液洗一次, 用含 10% 灭活小牛血清的低糖 DMEM 培养液在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养, 消化液采用胰蛋白酶及 EDTA 消化液, 胰蛋白酶终浓度为 0.125%, EDTA 终浓度为 0.05%。每 3 天按 1:3 比例传代一次, 24 孔板中每孔按 1×10^6 个细胞密度来培养, 均取对数生长期的细胞用于实验。

1.4 HepG2 细胞胰岛素耐受模型的复制

收稿日期: 2004-10-19 接受日期: 2005-01-10

重庆市自然科学基金资助项目(No.20038012)

* 通讯作者。Tel: 023-68733606, E-mail: chenqiu1969@yahoo.com.cn

按文献[3]进行, 稍作改进。将制备好的 HepG2 细胞悬液用含 2% 小牛血清 DMEM 洗涤一次, 然后按 1×10^6 个/孔, 接种于 24 孔培养板中。细胞贴壁后用不含小牛血清的 DMEM 培养液洗涤两次。加入 1 ml 新配制的含有或不含有 5×10^{-7} mol/L 人胰岛素的培养液 (不加胰岛素者为对照) 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中温育 24 h, 用不含胰岛素的培养液洗涤一次, 共 20 min。

1.5 胰岛素耐受的 HepG2 细胞模型鉴定

1.5.1 细胞的葡萄糖摄取率的检测(采用 ^3H -D-葡萄糖掺入实验评价细胞的胰岛素敏感性) 将经过 24 h 温育的细胞加入不含小牛血清的 DMEM 培养液 (1 ml/孔), 分别含 1 ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml 人胰岛素或不含人胰岛素, 于 37°C 、5% CO_2 条件下预温育 30 min。加入 ^3H -D-葡萄糖 (1.3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 培养液中) 温育 2 h。加入冰冷的磷酸缓冲液快速洗涤细胞以终止反应。细胞用 0.5 ml 200 g/L KOH 融解后, 转移至玻璃试管中。取出 100 μl 细胞融解液, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。冷乙醇溶液洗涤 2 次。室温、3000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液, 将沉淀物(糖原)倒置沉积在直径 2 cm 的滤纸片上(反复冲洗), 滤纸片用冷藏于 4°C 的冷乙醇搅拌洗涤 4 次, 共 3 h。将滤纸片烘干后置于 10 ml 闪烁液中测定放射性计数(膜片法, 闪烁液为二甲苯或甲苯的 POP-POPOP 系统)。根据 ^3H -D-葡萄糖的比放射性, 细胞融解液的蛋白质浓度及糖原的放射性, 可计算出 ^3H -D-葡萄糖的掺入率, 单位为 $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。公式为: 葡萄糖的摄取率 = 糖原的放射性计数(cpm)/[^3H -D-葡萄糖的比放射性($\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) $\times$ 细胞融解液的蛋白质浓度(mg/ml) $\times$ 细胞融解液体积(ml) $\times$ 温育时间(h)]

1.5.2 残余 ^{125}I -胰岛素结合率测定 将各组细胞分别置于含 1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml 人胰岛素的 DMEM 培养液中温育 2 h。弃培养液, 于 4°C 条件下, 用预冷的 pH 4.0 的 DMEM 培养液及 0.01 mol/L PBS 分别冲洗 5 次。每孔中加 2 ml 含 3 μCi ^{125}I -胰岛素的 DMEM 培养液, 4°C 温育 3 h。弃培养液用 0.01 mol/L PBS 冲洗 5 次, 每孔中加入 1 ml 2.5 g/L 胰酶, 室温消化 25 min, 用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液终止反应。吹打细胞并移入测试管中, 用 1 ml PBS 洗 5 次, 洗液一并加入测试管中, 2000 r/min 离心 10 min。弃上清, 测沉淀放射计数。用 10^{-7} mol/L 胰岛素与 ^{125}I 胰岛素竞争结合后的

残余 ^{125}I -胰岛素结合量作为非特异性结合。未用胰岛素刺激的 HepG2 细胞残余 ^{125}I -胰岛素结合量作为对照。

1.6 细胞形态学变化

1.6.1 HE 染色 取有培养细胞生长的玻片, 37°C PBS 漂洗培养液及杂质, 4% 多聚甲醛固定 15 min 取出晾干, 常规 HE 染色。倒置相差显微镜观察细胞的大体形态

1.6.2 透射电镜 选生长良好的细胞, 胰酶消化, PBS 洗涤 2 次, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 2.5% 戊二醛预固定, 再用 2% 锇酸后固定, 经梯度酒精脱水后用 EPON812 包埋, 制作超薄切片 (600 $\text{\AA}$), 经醋酸铅和柠檬酸铝双染后, 用透射电镜观察其超微结构。照像、记录观察结果。

1.7 统计学处理

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$), 两组间计量资料比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 实验各组 HepG2 肝癌细胞 ^3H -D-葡萄糖掺入率的比较

见表 1, 在培养液不含胰岛素的基础状态下, 高浓度胰岛素细胞的葡萄糖掺入率与对照组并无差异; 在培养液中加入胰岛素后, 高浓度胰岛素细胞的葡萄糖掺入率在各种浓度的胰岛素刺激下均显著低于对照细胞。并且高胰岛素细胞与对照细胞的 ^3H -D-葡萄糖掺入率随着胰岛素浓度的升高而升高, 但前者升高的幅度显著低于后者。

2.2 实验各组 HepG2 细胞残余 ^{125}I -胰岛素结合率的比较

见表 2, 高浓度的胰岛素刺激 24 h 后, 模型组 HepG2 细胞残余 ^{125}I -胰岛素结合率明显低于对照组 ($P < 0.01$), 提示胰岛素耐受的 HepG2 细胞模型复

表 1 实验各组 HepG2 肝癌细胞的 ^3H -D-葡萄糖掺入率($\bar{x} \pm s$)

	高浓度胰岛素细胞	对照细胞
实验次数	8	8
胰岛素浓度		
0 ng/ml	20.3 $\pm$ 1.0**	12.1 $\pm$ 0.8
1 ng/ml	10.1 $\pm$ 0.3*	14.8 $\pm$ 0.5
10 ng/ml	13.5 $\pm$ 0.8**	19.9 $\pm$ 0.7
50 ng/ml	16.2 $\pm$ 0.9**	25.4 $\pm$ 1.0
100 ng/ml	19.7 $\pm$ 1.0**	28.9 $\pm$ 1.4
200 ng/ml	22.0 $\pm$ 1.1**	31.5 $\pm$ 1.2

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。表中各数据单位为 $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

表2 实验各组 HepG2 细胞 ^{125}I -胰岛素结合率的比较($\bar{x} \pm s$)

	高浓度胰岛素细胞	对照细胞
实验次数	5	5
胰岛素浓度		
1 ng/ml	256 $\pm$ 95**	549 $\pm$ 198
10 ng/ml	387 $\pm$ 132**	764 $\pm$ 243
100 ng/ml	431 $\pm$ 215**	902 $\pm$ 187

与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

制成功。并且高胰岛素细胞与对照细胞的 ^3H -D-葡萄糖掺入率随着胰岛素浓度的升高而升高。

2.3 胰岛素耐受的 HepG2 细胞模型耐受持续时间的观察

将模型细胞置于不含胰岛素的培养液中 60 h, 使胰岛素受体数目上调, 再重复上述实验(胰岛素浓度为 100 ng/ml), 结果发现模型细胞的 ^3H -D-葡萄糖摄取率(20.8 ± 1.1)仍明显低于对照细胞(29.3 ± 1.4)($P < 0.01$)。

2.4 胰岛素耐受模型细胞的形态学变化

光镜下模型细胞呈梭形和多边形,核大,核浆比例失调,有时可见多个核仁,胞浆内有大量空泡形成,呈典型的肿瘤细胞形态学表现。模型细胞与对照细胞比较,均未见明显差别(图1)。

透射电镜下,模型细胞与对照细胞均具有肿瘤细胞的典型的亚细胞结构特征,如细胞核及核仁均较大,胞质中线粒体和高尔基器发达,有时可见胞质中出现空泡,胞膜向外延伸形成较多微绒毛和胞质突起等。与对照细胞相比,未见模型细胞有特征性的亚细胞结构改变(图2)。

3 讨论

胰岛素耐受在整体情况下是指由于胰岛素受体和/或受体后缺陷使生理浓度的胰岛素不能维持血糖在正常水平,即靶组织对胰岛素反应的敏感性下降,常伴有高胰岛素血症^[1]。在细胞水平胰岛素耐受的定义为由于细胞表面胰岛素受体数目减少和/或受体后缺陷,一定浓度的胰岛素不能使细胞达到其相应代谢水平,只有提高胰岛素浓度才能达到预期代谢水平。胰岛素最主要的生物学效应是促进机体组织细胞葡萄糖代谢,故通常所言胰岛素耐受即是指机体对胰岛素促进葡萄糖摄取利用的效应产生了抗性。

肝脏及外周组织(骨骼肌、脂肪)是产生胰岛素耐受的主要部位。在研究胰岛素等激素的结合与作用中,细胞模型提供了重要的研究工具;例如人的

脂肪细胞(3T3-L1)、肌细胞(L_6)、动物的肝细胞系在胰岛素的结合与作用中被广泛地应用,但人的肝细胞系却一直未被建立。HepG2 细胞源于人的肝胚胎瘤细胞,保留了肝细胞的许多特征,其表面表达高亲和力的胰岛素受体满足典型胰岛素受体所要求的标准包括葡萄糖摄取、糖原合成酶的活性、脂类生成及 RNA 的合成。Amatruda 等^[4]将 HepG2 细胞与高浓度胰岛素($5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$)共同温育后,有胰岛素受体和受体后的功能缺陷,受体自身磷酸化功能和胰岛素刺激的糖、脂、蛋白质代谢功能降低。因而 HepG2 是研究糖尿病胰岛素耐受的理想细胞模型。在目前的胰岛素耐受研究中,尤其研究胰岛素耐受发生机制及药物对机体胰岛素敏感性的影响,常需要使用胰岛素耐受细胞模型。国外从 20 世纪 90 年代初即开始这方面的研究,并已成功复制数种胰岛素耐受细胞模型^[5,6],这些细胞模型主要有高胰岛素诱导培养、高葡萄糖培养、游离脂肪酸(FFA)诱导等模型,其中以高胰岛素培养模型最为稳定、可靠,使用也最为广泛。

HepG2 细胞表面也存在胰岛素受体,其受体数目受胰岛素水平的调节,当胰岛素受体数目下调至一定程度时,则该细胞对胰岛素的作用产生抗性。本研究将 HepG2 细胞置于高浓度胰岛素培养液中 24 h,通过检测残余 ^{125}I -胰岛素结合率即残余胰岛素受体数目,结果显示高浓度胰岛素刺激后,胰岛素受体数目明显减少。胰岛素最主要的生物学作用是促进葡萄糖代谢。胰岛素耐受最主要特征是机体对胰岛素促进葡萄糖的摄取发生了抗性,因此利用 ^3H -D-葡萄糖掺入实验检测细胞的葡萄糖摄取率可以较准确地评价细胞的胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用能力,即胰岛素敏感性,从而判断是否存在胰岛素耐受。本研究结果提示,运用高胰岛素诱导培养法可使 HepG2 肝癌细胞表面胰岛素受体数目明显减少,胰岛素刺激的葡萄糖掺入率显著下降,胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用发生障碍,即发生胰岛素耐受。此外,本实验的葡萄糖掺入率数据接近文献报导,提示本研究使用的 ^3H -D-葡萄糖掺入实验具有较高的可靠性和稳定性。为观察高胰岛素诱导胰岛素耐受的 HepG2 细胞模型的耐受持续时间我们将模型细胞置于不含胰岛素的培养液中 60 h,使胰岛素受体数目上调,再重复上述实验发现高胰岛素诱导的胰岛素耐受 HepG2 细胞的 ^3H -D-葡萄糖摄取率仍明显低于对照细胞,表明高胰岛素诱导的胰岛素耐

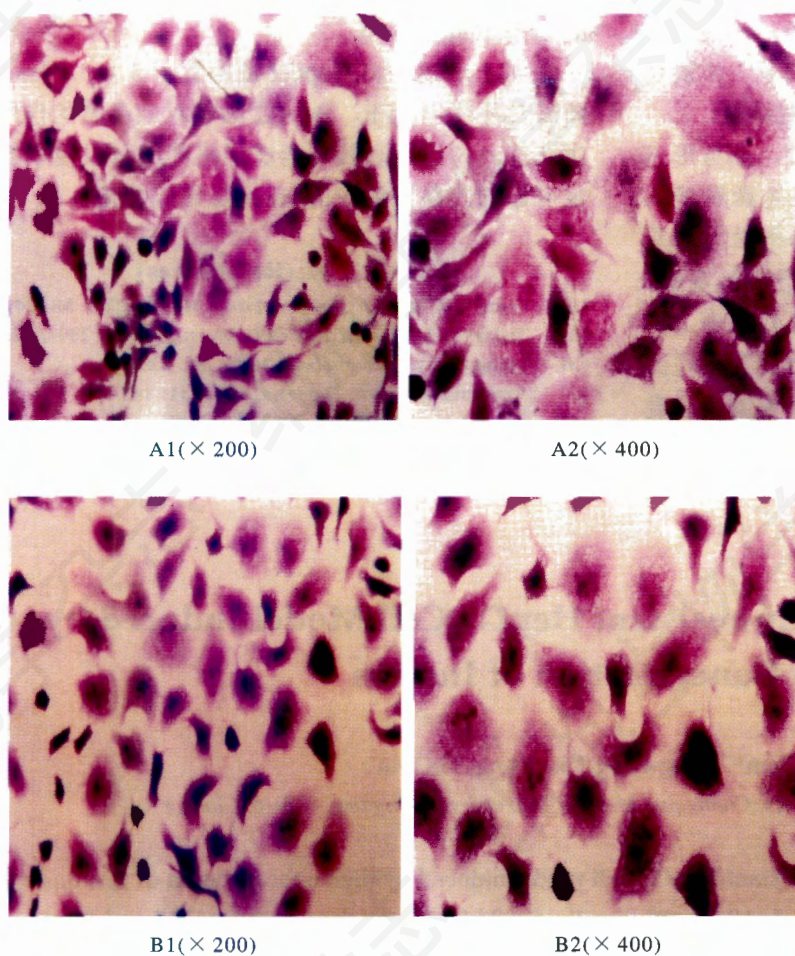


图1 胰岛素耐受模型细胞和对照细胞的HE染色照片

A1,A2: 对照HepG2细胞; B1,B2: 胰岛素耐受HepG2细胞。可见胞核蓝染, 胞浆红染。

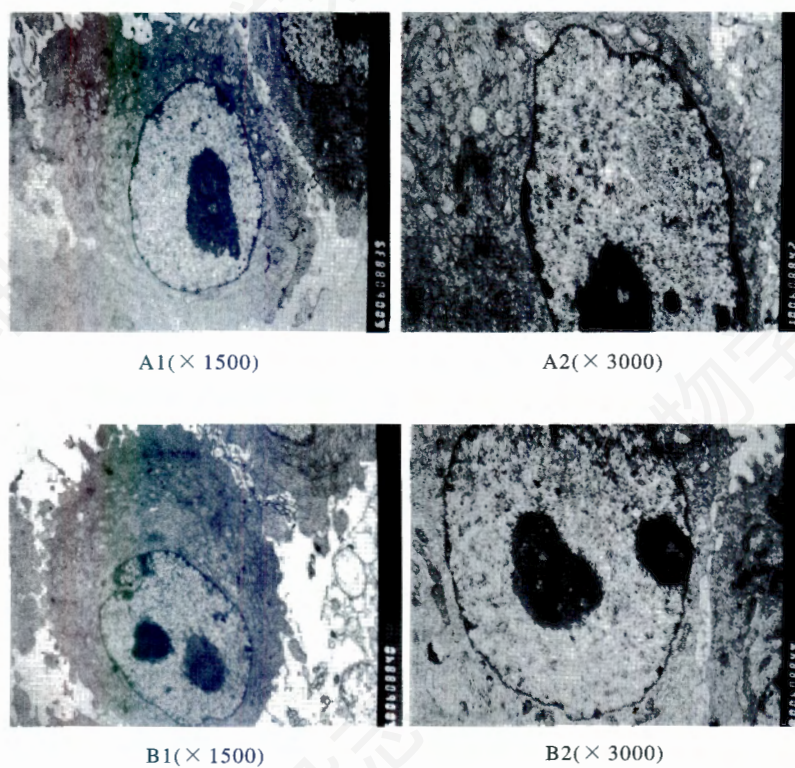


图2 胰岛素耐受模型细胞和对照细胞的透射电镜照片

A1, A2: 对照HepG2细胞; B1, B2: 胰岛素耐受HepG2细胞。可见细胞核较大, 胞质中线粒体和高尔基器发达, 有时可见胞质中出现空泡, 胞膜向外延伸形成较多微绒毛和胞质突起等。

受的HepG2细胞模型在较长的时间内(60 h)维持了对胰岛素产生抵抗的特性。这将会为我们下一步胰岛素增敏剂药效学的观察提供充分的时间储备。

任何功能的改变都有其形态学基础,而且形态学改变发生在功能改变之前,因此胰岛素耐受的HepG2细胞与对照细胞肯定存在着形态学上的差异。但无论是HE染色光镜观察还是透射镜观察,均未发现HepG2胰岛素抵抗细胞的特征性改变。推测胰岛素耐受的HepG2细胞的形态学改变发生在比亚细胞结构更精细的水平,普通光镜和电镜难以观察。要揭示这种精细的变化,需要借助分辨率更高

的形态学观察技术。

综上所述,将HepG2细胞置于 5×10^{-7} mol/L胰岛素环境中24 h, HepG2细胞对胰岛素的作用产生抗性。即运用高胰岛素诱导培养法可以复制出稳定可靠的胰岛素耐受的HepG2细胞模型。

参考文献 (References)

- [1] Gurnell M *et al.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**: 2412
- [2] Tadayyon M *et al.* *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, **12**: 307
- [3] Melin B *et al.* *Metabolism*, 1990, **39**: 1089
- [4] Amatruda JM *et al.* *Diabetes*, 1982, **31**: 145
- [5] Senn JJ *et al.* *Diabetes*, 2002, **51**: 3391
- [6] Bernal-Mizrachi C *et al.* *Nat Med*, 2003, **9**: 1069

Establishment of Insulin-resistant HepG2 Cell Model Induced by High Concentration of Insulin

Qiu Chen*, Yong-Peng Xia, Zong-Yin Qiu

(Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To establish insulin resistant HepG2 cell model induced by high concentration of insulin *in vitro* culture. HepG2 cells were incubated with 5×10^{-7} mol/L insulin for 24 hours, washed with DMEM and finally with pre-cold PBS. The residual ^{125}I -insulin binding and the insulin-stimulated ^3H -D-glucose incorporation were determined. It was demonstrated that the residual ^{125}I -insulin binding and incorporation rate of ^3H -D-glucose in insulin-resistant HepG2 cells were decreased significantly than that in control cells. Insulin-resistant HepG2 cells were free from stimulation for 60 hours by insulin, but the incorporation rate of ^3H -D-glucose were remaining lower than that in control cells. HepG2 cells exposed to 5×10^{-7} mol/L insulin for 24 hours were able to induce a state of insulin resistance and reproduce a insulin-resistant cell model. The state of insulin resistance could be maintained for 60 hours. The method is simple, practicable and reliable.

Key words insulin resistance; cell model; HepG2 cell line

Received: October 19, 2004 Accepted: January 10, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing City (No.20038012)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68733606, E-mail: chenqiu1969@yahoo.com.cn