

胰岛素和 IGF-I 对离体犊牛小肠上皮细胞增殖和吸收功能的影响*

马玉敏** 王恬

许若军

(南京农业大学动物科技学院 南京 210095) (香港大学动物学系 香港)

新生哺乳动物胃肠道的生长发育十分迅猛,这与初乳的摄入有关。初乳中含有大量多肽类生长因子,如胰岛素、胰岛素样生长因子-I (Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I)、表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)和转化生长因子(transforming Growth Factors, TGFs)等,这些乳源性肽类生长因子对新生动物胃肠道细胞的增殖、生长和分化起着关键作用^[1]。已有大量文献报道了乳源性生长因子对动物胃肠道细胞生长发育的调节作用,但主要集中在体内动物试验,实验结果受到多种体内因素(神经、体液及肠道环境)的影响,且试验费用昂贵,试验周期较长。体外试验操作简单,易于分析某一生长因子的单因素影响作用,特别是各种生长因子的结构和功能高度保守,这为乳源性生长因子的体外研究提供了可能。本试验通过体外犊牛小肠上皮细胞培养方法,以细胞增殖率和葡萄糖吸收率作为细胞生长发育与功能成熟的指标,研究了胰岛素与 IGF-I 对细胞生长发育的影响,为新生胃肠道营养发育生理研究提供科学依据与研究方法。

材料和方法

1. 细胞的分离与培养

出生 1 日龄以内未吮乳的中国荷斯坦犊公牛(南京卫岗血清厂)经宰杀放血,于无菌环境下取 10cm 左右十二指肠,迅速放入预热至 37℃ 的生理盐水。根据 Evans 等(1992)方法^[2],获取小肠上皮细胞,并以台盼兰染液进行细胞计数,细胞活力大于 85% 者用于细胞培养。最后种植于 24 孔板(NUNC),细胞浓度为 1×10^5 细胞/ml。置 37℃, 5% CO₂、95% H₂O 的 CO₂ 培养箱中静止培养。细胞经上述培养 48h 后,更换为含不同浓度胰岛素(Lilly, 美国)或 IGF-I(Sigma)的 DMEM/F₁₂ 培养液。胰岛素分为 5 个浓度组:分别为 0.01、0.1、1、10 和 50μg/ml。IGF-I 也分为 5 个浓度组:分别为 1、10、100、500 和 1000ng/ml。以无血清培养液为对照组。继续培养 72 小时,检测细胞增殖率。

2. 细胞增殖率的检测

各试验组细胞在更换试验培养液 72 小时后,弃去试验培养液,每孔加入 200μl 无血清的 DMEM/F₁₂。同时每孔加入 200μl、0.05% 的 MTT(Sigma)。37℃ 培养 4 小时,弃掉 MTT 及培养基,然后每孔加入 0.5ml 二甲基亚砜,待细胞内的紫蓝色晶体完全溶解后酶标仪(550 型, BIO-RAD)上测 OD₅₄₀。

3. 葡萄糖吸收量的检测

配制葡萄糖含量为 4.00mg/ml 的生理盐水,并分别添加胰岛素和 IGF-I,使胰岛素的浓度分别为 0.01、0.1、1、10 和 50μg/ml, IGF-I 的浓度分别为 1、10、100、500 和 1000ng/ml。所有细胞经分离后并在含 15% NCS 的 DMEM/F₁₂ 中培养 48 小时,以各试验组生理盐水孵育细胞 30 分钟。立即按试剂盒(上海荣盛生物工程公司)要求测葡萄糖吸收量,以考马斯亮兰试剂盒(南京建成生物工程研究所)分别测各处理组细胞的总蛋白含量。总葡萄糖含量减去剩余量即为葡萄糖吸收量。

4. 数据分析

所得数据均数间($n = 10$)进行显著性检验。采用 SPSS9.0 软件进行单因子 ANOVA 分析和 LSD 多重比较。所有结果以平均数 ± 标准差表示。

结果与分析

1. 细胞增殖率

在 0.1μg/ml、1μg/ml 和 10μg/ml 时,胰岛素对细胞增殖有促进作用。但 0.01μg/ml 的胰岛素作用很微弱,与对照组差异不显著($P > 0.05$),随着浓度的增加,胰岛素对细胞增殖的促进作用逐渐增强,并在 10μg/ml 获得最大增殖效果。但当浓度达到 50μg/ml 时,胰岛素则抑制细胞的增殖(图 1a)。IGF-I 对细胞的促增殖规律与胰岛素不同,随着浓

本文 2001 年 4 月 27 日收到,9 月 8 日接受。

本文联系人王恬教授。

* 教育部高校骨干教师项目 E200012, 香港大学合作课题 X9911。

** 南京农业大学硕士研究生。现工作地址:上海市彭联路 101 号,光明乳业股份有限公司技术中心,邮编:200072。

度的增加,IGF-I的作用效果逐渐升高,浓度达到并超过100ng/ml时,促增殖作用无明显变化,但没有出现抑制增殖的现象。IGF-I的浓度在100ng/ml、

500ng/ml和1000ng/ml之间对促进细胞增殖没有显著性差异($P>0.05$)(图1b)。

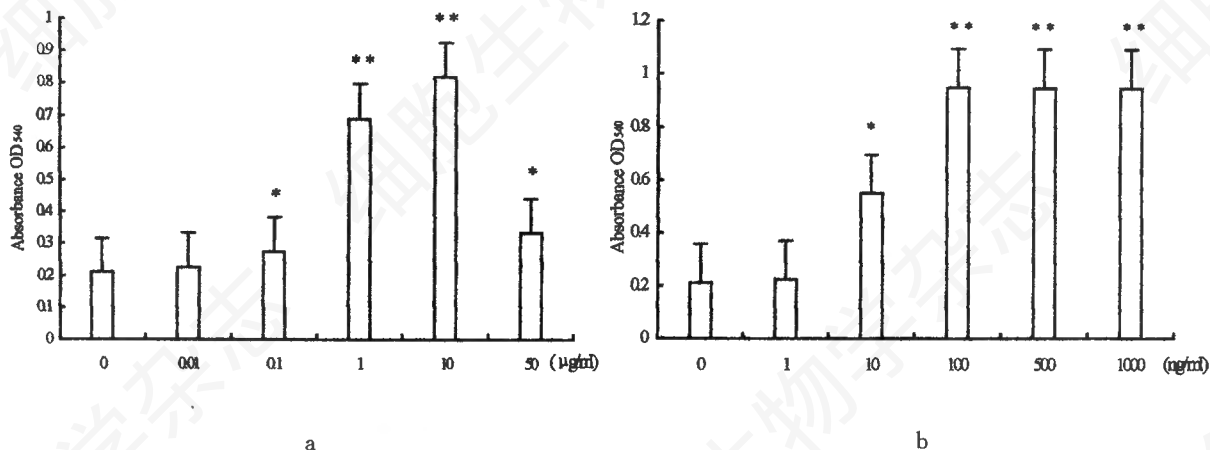


图1 胰岛素(a)和IGF-I(b)对犊牛小肠上皮细胞增殖的影响

(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

2. 葡萄糖吸收量

胰岛素和IGF-I的浓度影响细胞吸收葡萄糖。胰岛素在0.01µg/ml时,与对照组差异不显著($P>0.05$),随着浓度的增加,胰岛素对促细胞吸收葡萄糖的作用逐渐增强。在10µg/ml时达到最大值,但达到50µg/ml的超生理浓度时反而抑制细胞吸收葡萄糖,其作用强度小于1µg/ml(表1)。而IGF-I在1-1000ng/ml的浓度范围内对促进细胞吸收葡萄糖的作用逐渐增强,在10-1000ng/ml时,显著高于对照组($P<0.01$)。但在浓度超过100ng/ml时,其作用趋向饱和。IGF-I浓度在100ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml三者之间对细胞吸收葡萄糖的影响无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

表1 胰岛素对犊牛小肠上皮细胞吸收葡萄糖的影响

胰岛素浓度(µg/ml)	葡萄糖吸收量(mg/100mg cell protein)
0(control)	4.075 ± 0.376 ^a
0.01	4.262 ± 0.870 ^a
0.1	6.987 ± 0.507 ^b
1	14.966 ± 0.374 ^c
10	18.119 ± 0.870 ^d
50	11.004 ± 0.173 ^{de}

同列数据中标有相同上标字母表示差异不显著,不同上标字母表示差异显著,其中小写字母代表 $P<0.05$,大写字母代表 $P<0.01$ 。

表2 IGF-I对犊牛小肠上皮细胞吸收葡萄糖的影响

IGF-I浓度(ng/ml)	葡萄糖吸收量(mg/100mg cell protein)
0(control)	4.075 ± 0.376 ^a
1	4.124 ± 0.381 ^a
10	7.204 ± 0.434 ^b
100	19.611 ± 0.548 ^c
500	19.617 ± 0.360 ^c
1000	19.710 ± 0.622 ^c

同列数据中标有相同上标字母表示差异不显著,不同上标字母表示差异显著,其中小写字母代表 $P<0.05$,大写字母代表 $P<0.01$ 。

讨 论

1. 胰岛素和IGF-I对离体小肠上皮细胞增殖的影响

迄今已有文献报道了胰岛素和IGF-I对离体细胞株增殖的促进作用^[3],但对小肠上皮细胞作用的报道十分鲜见。小肠上皮细胞含有大量的胰岛素和胰岛素样生长因子(IGFs)质膜受体。Duncan(1994)认为,IGF-I(5×10^{-9} mol/L)主要是通过结合IGFs受体而加快细胞分裂的速度,通过缩短S期时间,缩短细胞分裂周期,胰岛素(2×10^{-6} mol/L, 1000倍于生理浓度)也可通过结合IGFs受体而同样缩短细胞分裂周期。由于胰岛素对IGFs受体的亲和力较低,胰岛素的浓度必需高于IGF-I的浓度,才能发挥功效。本试验结果表明,高于生理浓度的

胰岛素和 IGF-I 对小肠上皮细胞均有明显的促增殖作用。有报道认为表皮生长因子(EGF, 5×10^{-9} mol/L)的主要作用是诱导细胞从 G0 期至 G1 期的老化,所以 IGF-I 和胰岛素必需有 EGF 的诱导才能促进细胞增殖,单独使用效果不明显。但本试验同时发现,在没有添加 EGF 的情况下,单独使用超生理浓度的胰岛素($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)和 IGF-I($\geq 100 \text{ng}/\text{ml}$),同样显著地促进了小肠上皮细胞的增殖。这说明,胰岛素和 IGF-I 在较高浓度时同样可以促进离体犊牛小肠上皮细胞的增殖,即胰岛素和 IGF-I 对刺激上皮细胞生长发育的作用具有浓度依赖性。Ichiba 等报道,人乳中的 IGF-I 在低浓度时($< 5 \times 10^{-11}$ mol/L)对胎儿肠细胞的促增殖作用微弱,但高浓度时($> 5 \times 10^{-9}$ mol/L)的作用显著,甚至超过 EGF(5×10^{-8} mol/L)的作用^[4]。有报道认为,胰岛素在超生理浓度时也显示有 IGF-I 的促细胞增殖作用^[5]。另外,不同的细胞类型对胰岛素和 IGF-I 刺激的反应不同,本试验采用离体新生犊牛的小肠上皮细胞,研究乳源性生长因子对新生胃肠道生长发育的影响,可以避免因采用一般商品细胞株造成与实际不一致的影响。

本试验中出现的超高浓度 IGF-I 的饱和作用,可能与细胞内的受体数量限制有关。胰岛素和 IGF-I 的受体均属于酪氨酸蛋白激酶(PTK)型受体,细胞在合成这种受体的同时也分解受体,而且受体所能连接的配体数量是有限的。IGFs 受体有两类: I 型和 II 型受体。胰岛素可结合 I 型受体,但其亲和力远低于 IGF-I,因此胰岛素的促增殖效果低于 IGF-I^[6]。这与本试验结果吻合。但目前尚不清楚超高浓度胰岛素对细胞增殖产生抑制作用的原因,可能是因为胰岛素的超高浓度抑制了细胞对葡萄糖的吸收,降低了细胞的代谢速度所致。

2. 胰岛素和 IGF-I 对离体小肠上皮细胞吸收葡萄糖的影响

本试验结果表明,适当浓度的胰岛素可促进细胞吸收葡萄糖,而高浓度的胰岛素则抑制细胞吸收葡萄糖。IGF-I 对犊牛小肠上皮细胞吸收葡萄糖的影响作用不同于胰岛素,高浓度的 IGF-I 并不抑制葡萄糖的吸收,但 IGF-I 在高浓度时促细胞吸收功能却有饱和性,当浓度超过 $100 \text{ng}/\text{ml}$ 时,对促细胞吸收葡萄糖的影响很小。

肠道黏膜上皮细胞吸收功能的强弱是细胞发育程度的重要标志之一。Prosser 等报道,胰岛素和 IGF-I 对促使小鼠乳腺上皮细胞吸收葡萄糖的 ED_{50}

分别是 $8 \text{ng}/\text{ml}$ 和 $16 \text{ng}/\text{ml}$, 过高浓度的胰岛素和 IGF-I 抑制细胞吸收葡萄糖,而胰岛素与 IGF-I 在生理浓度范围内联合使用,其效果是它们单独使用时效果的叠加^[7]。胰岛素作为一种激素和生长因子,对调节细胞代谢的作用是双向的^[8]。本试验也证明胰岛素在较低浓度时促进细胞吸收葡萄糖,而在过高浓度时抑制细胞的吸收。有报道认为 IGF-I 可能通过结合胰岛素受体而产生与胰岛素相类似的合成代谢反应,即低浓度促进葡萄糖的吸收,高浓度抑制葡萄糖的吸收。但 IGF-I 与胰岛素受体的结合力比胰岛素小 100 倍^[9]。因此,理论上 IGF-I 诱导代谢改变的强度应低于胰岛素。然而本试验及相关体内试验证明,IGF-I 促进细胞增殖和吸收葡萄糖的效果高于胰岛素。因此在体内正常生理状况下,IGF-I 不太可能通过结合胰岛素受体而发挥调节代谢的作用。据报道,IGF-I 与 IGFs 受体(包括 I 型和 II 型)结合后,主要是促进组织细胞的增殖和生长,另外也有促细胞合成代谢的作用^[10]。这提示 IGF-I 可能是通过结合 IGFs 受体而促进细胞吸收葡萄糖。而超高浓度的 IGF-I 所产生的葡萄糖吸收饱和现象可能与细胞质膜 IGFs 受体数量有关。另外,不同的细胞类型和同种细胞在不同的细胞周期对结果也有影响。适当浓度的胰岛素和 IGF-I 可促进新生胃肠道细胞的生长发育与功能成熟,相关的研究尚待进一步深入开展。

摘 要

本试验选择离体犊牛小肠上皮细胞,以细胞增殖率和葡萄糖吸收率作为细胞生长发育与功能成熟的指标,研究了胰岛素与胰岛素样生长因子-I(IGF-I)对细胞生长发育的影响。结果表明,胰岛素浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时,明显促进小肠上皮细胞的增殖和对葡萄糖的吸收,浓度达到 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时则抑制细胞的增殖和吸收($P < 0.01$)。IGF-I 浓度为 $100 \text{ng}/\text{ml}$ 时,对促进小肠上皮细胞增殖和吸收葡萄糖的作用最强($P < 0.01$),但 $100 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $500 \text{ng}/\text{ml}$ 和 $1000 \text{ng}/\text{ml}$ 三种不同浓度的 IGF-I 对刺激细胞增殖和提高吸收功能无显著差异($P > 0.05$)。

关键词: 胰岛素 IGF-I 小肠上皮细胞

参 考 文 献

- [1] Xu, R. J., 1998, *Food Rev Int*, **14**: 1-9.
- [2] Evans, G. S., 1992, *J cell Sci*, **101**: 219-231.

- [3] Duncan, M. D. et al., 1994, *Digestive Diseases Sci.* **39**: 2197-2201.
- [4] Ichiba, H. et al., 1992, *Bio Neonate*, **61**:47-53.
- [5] Straus, D. S., 1984, *Endocr Rev*, **5**:356-369.
- [6] Young, G. P., 1990, *Digestion*, **46**(suppl2):240-247.
- [7] Prosser, C. G. et al., 1987, *Endocrinology*, **120**: 1411-1416.
- [8] Westergaard, H., 1989, *Am J Physiol*, **256**:G911-918.
- [9] Czech, M. P., 1989, *Cell*, **59**:235-239.
- [10] Bird, A. R. et al., 1996, *J Anim. Sci*, **74**:2523-2540.

EFFECTS OF INSULIN AND IGF-I ON THE PROLIFERATION AND FUNCTIONAL MATURATION OF CALF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS *IN VITRO*

MA Yu Min* WANG Tian* and XU Ruo Jun**

(* College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China

** Department of Zoology, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

ABSTRACT

The calf intestinal epithelial cells *in vitro* (CIEC) were selected to evaluate the trophic actions of insulin and IGF-I. The cell proliferation and glucose absorption were investigated. Results showed that insulin with a dosage of 10 μ g/ml and IGF-I with 100ng/ml both had strong stimulating effects on the proliferation and glucose absorption of CIEC ($P < 0.01$), while insulin with a dosage of 50 μ g/ml inhibited the proliferation and glucose absorption of CIEC ($P < 0.01$). IGF-I with concentration exceeded 100ng/ml (500ng/ml and 1000ng/ml in this experiment) showed saturated effect. This suggested that IGF-I at a dosage of 100ng/ml, 500ng/ml or 1000ng/ml had similar actions. The results suggested that natural growth factors in colostrum had significantly effects on the growth and functional development of intestinal epithelial cells *in vitro*.

Key words: Insulin, IGF-I, Intestinal epithelial cells

阳性脂质体介导反义寡聚核苷酸转染 HeLa 细胞的效果研究

陶茂莹*

高久洋**

(* 中国预防医学科学院 协和公共卫生学院 北京 100021)

(** 日本千叶工业大学生物化学系 千叶 275-0016)

阳性脂质体(Cationic Liposomes)是一系列本身带有正电荷的脂质物质,近年来被广泛用作介导核酸类物质(或药物等)转染细胞的载体,并被尝试性地用于临床上的基因治疗^[1]。本研究利用荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)标记和流式细胞技术(Flow Cytometry, FCM),对目前几种较为常用的阳性脂质体介导反义寡聚核苷酸转染 HeLa 细胞的效果进行了研究和分析。

材料与方法

一、材料

1. 细胞株 选用人宫颈癌上皮细胞(HeLa, 源于 Takaku 实验室),培养于含 15% 牛血清的 DMEM 培养基(GIBCO)中。

2. 寡聚核苷酸 用 19 个碱基的寡聚核苷酸(Phosphodiester Oligodeoxynucleotides, ODN19)和同样序列但经化学修饰的寡聚核苷酸(Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide, S-

ODN19)作为转染物质。两种寡聚核苷酸是 BioS(JAPAN)公司经 FITC 标记合成并经高效液相层析精制纯化后提供的标准品,其序列为 5'-CTC AGT TAG GGT TAG ACA A-3'。

3. 阳性脂质体 四种阳性脂质体分别为:Lipofectin(GIBCO)、LipofectAmine(GIBCO)、FuGENE6(Boehringer Mannheim Co.)和 DMRIE-C(GIBCO)。

二、方法

1. 细胞转染 HeLa 细胞培养于 6 孔板中(10⁶ 个细胞/孔/2ml 培养基),培养至细胞融合度达 80% 时用无血清培养基清洗后备用。将各种阳性脂质体与寡聚核苷酸以 2(μ l)比 1(μ g)的比例混匀后,用无血清 DMEM 培养基 50 μ l 稀释,置室温 15min 以形成脂质体-寡聚核苷酸复合体。将该复合体溶液分别加入上述已含 2ml 无血清 DMEM 培养基的 HeLa 细胞培养物中(寡聚核苷酸的最终浓度为 2 μ mol/L),转染 4h 后更换为含 15% 血清的 DMEM 培养基,继续培养 16h 收获

本文 2001 年 6 月 12 日收到,2002 年 1 月 3 日接受。