

研究简报

胰岛素对 PC12 细胞神经型一氧化氮合酶表达及活性的影响

袁中瑞^{1,2)} 鲁丹丹¹⁾ 董晓敏³⁾ 古力努尔¹⁾ 程 晟¹⁾ 卢景芬^{1)*}¹⁾北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083;²⁾山东大学基础医学院病理生理学教研室, 济南 250012;³⁾北京大学医学部细胞生物学教研室, 北京 100083)

摘要 为探讨胰岛素对神经细胞中神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 的表达及活性的影响, 应用流式细胞术、原位杂交、电子自旋共振等技术方法研究胰岛素对 PC12 细胞中神经型一氧化氮合酶的影响。胰岛素作用 PC12 细胞 9 h 后, 神经型一氧化氮合酶的免疫荧光强度显著升高, 且呈浓度依赖关系, 其最大效应为对照的 (155 ± 13)% ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test)。加入胰岛素 (16 mU/L, 6 h) 也能够显著上调 nNOS mRNA 的表达, 为对照的 (182 ± 13)% ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test)。另外加入胰岛素 (16 mU/L) 作用 9 h 后, 神经型一氧化氮合酶的活性也显著升高, 为对照的 (167 ± 15)% ($P < 0.01$, $n = 4$, t -test)。由上述结果可知, 胰岛素对 PC12 细胞的神经型一氧化氮合酶的表达及活性有上调作用。

关键词 胰岛素, 神经型一氧化氮合酶, 流式细胞术, 原位杂交, 电子自旋共振, PC12 细胞

学科分类号 Q27

胰岛素在中枢神经系统内有多种功能, 参与神经元的生长和分化, 并与神经元和神经胶质细胞的代谢、饮食行为及学习记忆有关^[1,2]。关于脑内胰岛素的作用及机理的研究已成为近年来神经科学研究的热点之一。一氧化氮是介导神经细胞间信息传递的重要生物信使分子, 执行包括调节神经发育、脑血流、神经递质释放、突触的可塑性、学习记忆、基因表达调控等在内的多种重要生理功能^[3]。一氧化氮合酶主要有三种同工酶: 内皮细胞型一氧化氮合酶 (eNOS), 神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 和可诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)。前两者又称为构成型, 它们在生理情况下催化生成少量的一氧化氮执行细胞间信息传递功能。近年来的研究发现胰岛素可上调 eNOS 的表达及活性, 从而执行舒张血管的作用^[4]。那么, 胰岛素对另一种构成型一氧化氮合酶, 即 nNOS, 是否也有调节作用? 尚未见直接的实验证据。为了进一步探索胰岛素在神经系统中的调控作用, 本实验以大鼠肾上腺髓质细胞瘤细胞株 PC12 细胞为实验对象, 应用流式细胞术、原位杂交、电子自旋共振等技术方法研究胰岛素对神经型一氧化氮合酶的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PC12 细胞由中国科学院生物化学与细胞生物学研究所提供; 马血清、新生牛血清购自 HyClone 公司; 焦碳酸二乙脂 (diethyl pyrocarbonate, DEPC)、胰岛素 (I-5500)、二乙基二硫代氨基甲酸钠 (diethyldithiocarbamate, DETC)、N-硝基-L-精氨酸购自 Sigma 公司; 抗神经型一氧化氮合酶的一抗 (anti-nNOS Ab) 购自 Santa Cruz 公司; FITC 标记的抗 anti-nNOS Ab 的二抗购自 Jackson 公司。

nNOS mRNA 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。经地高辛标记的寡核苷酸探针序列为: ① 5'-CTGTC GTCCT CAACA ACCCA TATTC AGAGA-3'; ② 5'-TACCA GCTCA AGGAC ACAGA GCTCA TCTAT-3'; ③ 5'-GATGA CCAAC CGCCT TAGAT CTGAG TCCAT-3'。

* 通讯联系人。

Tel: 010-62091517, Fax: 010-62092724

E-mail: zdsjlf@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-03, 接受日期: 2003-06-23

1.2 PC12 细胞培养

PC12 细胞在高糖 DMEM 培养基中培养, 其中再加 10% 马血清, 5% 新生牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素. 将细胞传代接种于细胞培养瓶 (75 cm^2) 和 6 孔培养板 (培养板已预先放置了铺有多聚 L-赖氨酸的盖玻片), 培养 2~3 天, 待细胞长满后备用.

1.3 nNOS 免疫荧光标记及流式细胞术检测

参照 Sindermann 等^[5]的方法加以改进. 简言之, 在生长于细胞培养瓶 (75 cm^2) 的 PC12 细胞的培养基中分别加入 0, 2, 4, 8, 16 mU/L 胰岛素, 继续培养 9 h, 收集细胞. 经 70% 乙醇固定 30 min. 离心去除固定剂, 以磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 悬浮细胞制成单细胞悬液 (6×10^6 个/ml). 取 50 μl 该悬液加入 50 μl 20% 正常山羊血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 后, 继续加入 100 μl 一抗 (anti-nNOS, 1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h. 充分漂洗后, 以 300 μl PBS 悬浮细胞制成单细胞悬液, 加入 300 μl FITC 标记的二抗 (抗 anti-nNOS, 1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 30 min. 充分漂洗后, 以 PBS 悬浮细胞制成单细胞悬液 (1×10^6 个/ml), 取 0.5 ml 该悬液上流式细胞仪 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) 检测, 激发波长 488 nm, 接收波长 530 nm. 每个样品分析 1×10^4 个细胞, 用 Cell quest 软件进行数据获取和分析. 以 PBS 代替一抗与细胞温育后测定背景荧光强度.

1.4 原位杂交检测 nNOS mRNA

按 Ueta 等^[6]的方法及试剂盒说明书加以改进. 简言之, 将生长于含盖玻片的 6 孔培养板 PC12 细胞的培养基中, 分别加入和不加入胰岛素 (16 mU/L), 继续培养 6 h. 经 PBS 漂洗后, 4% 多聚甲醛固定, 室温 15 min, 0.06% H_2O_2 -甲醇 20 min 以灭活内源性过氧化物酶. 为抑制 RNA 酶对 RNA 的降解, 上述溶液均含 1/1000 DEPC. 爬片细胞经 PBS/DEPC 充分漂洗后, 预杂交液 37 $^{\circ}\text{C}$ 2~4 h, 探针杂交液 (nNOS mRNA 探针, 5~10 $\mu\text{g/L}$) 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 杂交后严格漂洗, 然后滴加封闭液, 室温 20 min, 不洗. 滴加兔抗地高辛溶液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 0.5 mol/L PBS 漂洗 5 min $\times$ 4 次. SABC 25 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 0.5 mol/L PBS 漂洗 5 min $\times$ 4 次. DAB 显色. 脱水、封片. 每批次均以预杂交液代替含探针的原位杂交液作阴性对照片一张. 应用自动图像分析仪 (Leica ce Q550) 进行细胞染色反应强度测定, 结果用吸光度表示.

1.5 一氧化氮合酶的活性测定

电子自旋共振是检测自由基的最直接、最灵敏的方法, 包括对一氧化氮自由基的检测. 乙酸乙酯提取法使 ESR 对一氧化氮自由基的检测灵敏度得到进一步提高, 该方法具有特异性和灵敏性. 通过特异地检测一氧化氮, 可以间接反映一氧化氮合酶的活性^[7]. 按 Zhang 等^[7]的方法稍加改进. 简言之, 在生长于细胞培养瓶 (75 cm^2) 的 PC12 细胞的培养基中分别加入和不加入胰岛素 (16 mU/L), 继续培养 9 h, 而后以胰蛋白酶消化收集细胞并计数. 每个样品取 2×10^6 个细胞并温育于 2 ml PBS (含 20 mmol/L 葡萄糖). 然后加入 L-精氨酸、 CaCl_2 、NADPH、 FeSO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 DETC, 终浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ L-精氨酸, 500 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} , 800 $\mu\text{mol/L}$ NADPH, 2 mmol/L Fe^{2+} , 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 10 mmol/L DETC. 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 30 min, 随后加入 1:5 (体积比) 的乙酸乙酯提取 (DETC) $_2$ -Fe (II)-NO 复合物. 将 200 μl 上层有机相装入石英测试管, 用电子自旋共振仪 (ESP-300, Bruker, Germany) 在室温下检测. 测试条件为: 频率 9.6 GHz, 调制频率 100 kHz, 调幅 3.2 G, 微波功率 20 mW, 中心磁场 3380 G, 扫场 400 G, 扫描时间 2 min. 一氧化氮信号强度以 $g = 2.034$ 处氮的三重超精细分裂第一峰的高度计算^[8], 每一数据重复 4 次.

1.6 统计学处理

采用 t 检验.

2 结 果

2.1 胰岛素对 nNOS 表达的影响

通过流式细胞术检测 nNOS 免疫荧光强度, 表明加入胰岛素能够上调 nNOS 的表达. 加入胰岛素温育 9 h 后, nNOS 在 PC12 细胞的表达显著增加, 表现为浓度依赖关系 (图 1), 其最大效应为对照的 $(155 \pm 13)\%$ ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test, 图 1).

2.2 胰岛素对 nNOS mRNA 表达的影响

为明确胰岛素引起的 nNOS 在细胞中表达升高是否通过影响 nNOS 基因转录而引起, 本实验以原位杂交技术检测了 nNOS mRNA 的表达, 发现加入胰岛素 (16 mU/L) 温育 6 h 后, nNOS mRNA 在 PC12 细胞的表达显著升高 (图 2), 其吸光度达到了对照的 $(182 \pm 13)\%$ ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test).

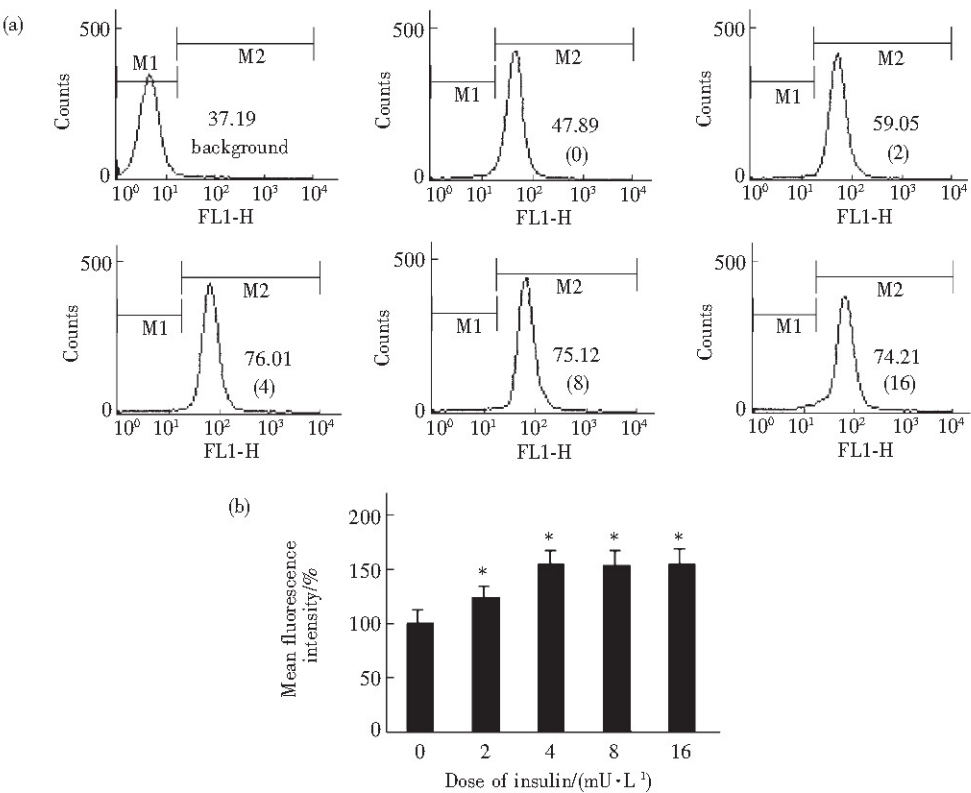


Fig. 1 Flow cytometric analysis results of nNOS protein in PC12 cells after insulin treatment

(a) representative histograms of nNOS in PC12 cells are shown. M1 and M2 fractions consisted of mostly nNOS protein-negative and -positive cells, respectively. The numerics at M2 fractions are mean fluorescence intensity of nNOS protein-positive cells. The numerics in parentheses at M2 fractions are the concentrations of insulin (mU/L). Secondary antibody alone was used for background fluorescence intensity. (b) dose-response curve. PC12 cells were incubated for 9 h with various concentrations of insulin as indicated above (**P* < 0.01, *n* = 3, *t*-test).

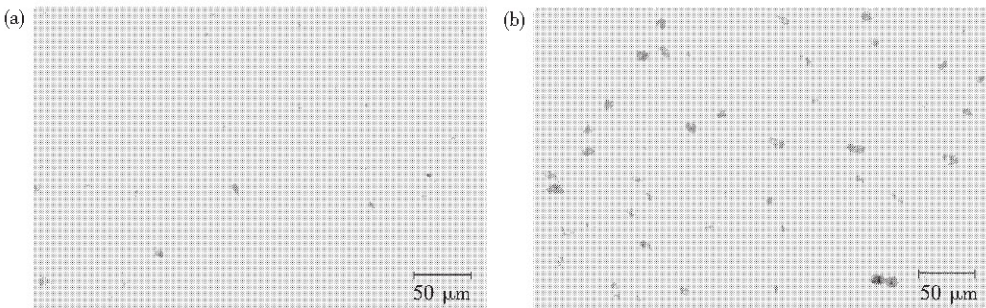


Fig. 2 The effect of insulin on the expression of nNOS mRNA in PC12 cells detected by *in situ* hybridization
(a) control cells; (b) insulin treated cells (16 mU/L, 6 h).

2.3 胰岛素对 nNOS 活性的影响

本实验通过应用 ESR 技术检测一氧化氮的水平, 进一步观察了胰岛素对 nNOS 活性的影响. 在底物 L-精氨酸及辅酶 NADPH 存在的情况下细胞产生较强的一氧化氮信号, 而在加入构成型一氧化氮合酶的特异抑制剂 N-硝基-L-精氨酸时, 信号强度

则减弱. 构成型一氧化氮合酶包括 eNOS 和 nNOS, 前者主要分布于血管内皮细胞, 而后者主要分布于神经细胞. 可见在本实验条件下一氧化氮主要由 nNOS 催化合成. 依据参考文献 [7], 以一氧化氮信号三重峰的第一峰高反映一氧化氮合酶的相对活性. 本实验发现加入胰岛素 (16 mU/L) 温育 9 h

后, PC12 细胞的 nNOS 活性显著提高 (图 3), 其产生的一氧化氮量达到了对照的 $(167 \pm 15)\%$ ($P < 0.01$, $n = 4$, t -test).

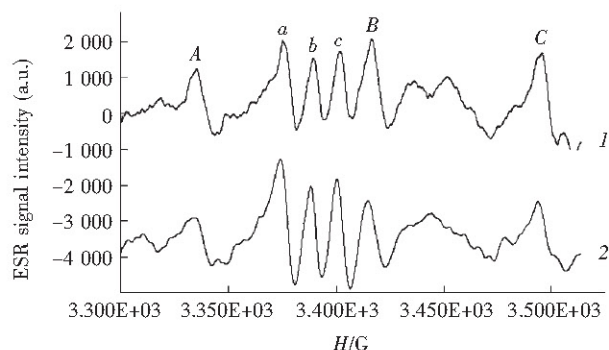


Fig. 3 ESR spectra of $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ (a, b, c) extracted from PC12 cultures and the signal of DETC with endogenous cooper (A, B, C)

Spectra were recorded with frequency 9.6 GHz, modulation frequency 100 kHz with 3.2 G modulation amplitude, microwave power 20 mW and central magnetic field 3 380 G with scan 400 G. 1: control; 2: insulin treatment (16 mU/L, 9 h).

3 讨 论

PC12 细胞在结构及功能上与神经元极其相似, 因此在国内外广为用作研究神经细胞结构和功能的模型. 本研究结果表明, 胰岛素可引起 PC12 细胞神经型一氧化氮合酶表达的显著升高, 通过 ESR 检测一氧化氮表明 nNOS 活性也显著提高. 可见胰岛素可上调 PC12 细胞中神经型一氧化氮合酶的表达及活性. 最近, Reagan 等^[9]报道在链脲菌素糖尿病大鼠的海马内 nNOS 蛋白质与 mRNA 表达都显著下降. 同样, Yu 等^[10]也观察到链脲菌素糖尿病大鼠的大脑皮层和小脑 nNOS 的表达和活性都显

著降低. 他们发现 nNOS 的降低主要是由于胰岛素的缺乏引起, 而非由于血糖的升高引起, 并且给与胰岛素可以恢复链脲菌素糖尿病大鼠小脑内的 nNOS 表达和活性水平. 上述 Reagan 和 Yu 等的报道与本实验结果相吻合. 本实验结果将有助于进一步明确胰岛素在脑内的生理和病理意义. 关于胰岛素上调 nNOS 表达的机理有待进一步的深入研究.

参 考 文 献

- 1 Wozniak M, Rydzewski B, Baker S P, *et al.* The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int*, 1993, **22** (1): 1~10
- 2 Zhao W Q, Alkon D L. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, **177** (1~2): 125~134
- 3 Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, **8** (1): 3~11
- 4 Kuboki K, Jiang Z Y, Takahara N, *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo*: a specific vascular action of insulin. *Circulation*, 2000, **101** (6): 676~681
- 5 Sindermann J, Weigel K A, Breithardt G. A simple method for the flow cytometric analysis of intracellular antigens in whole smooth muscle cells: quantification of cyclin-dependent kinase 2. *J Immunol Methods*, 1997, **202** (2): 205~212
- 6 Ueta Y, Levy A, Chowdrey H S, *et al.* Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology*, 1995, **136** (10): 4182~4187
- 7 Zhang Y T, Zhang D L, Cao Y L, *et al.* Developmental expression and activity variation of nitric oxide synthase in the brain of golden hamster. *Brain Res Bull*, 2002, **58** (4): 385~389
- 8 Mulsch A, Mordvintcev P, Bassenge E, *et al.* *In vivo* spin trapping of glycyl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessels and organs. *Circulation*, 1995, **92** (7): 1876~1882
- 9 Reagan L P, McEwen B S. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport*, 2002, **13** (14): 1801~1804
- 10 Yu E J, Juang S W, Chin W T, *et al.* Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 2000, **68** (6): 625~634

Insulin Regulated The Expression and Activity of Neuronal Nitric Oxide Synthase in PC12 Cells

YUAN Zhong-Rui^{1,2)}, LU Dan-Dan¹⁾, DONG Xiao-Min³⁾, GULI Nuer¹⁾, CHENG Sheng¹⁾, LU Jing-Fen^{1)*}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Health Science Center of Peking University, Beijing 100083, China;

⁽²⁾ Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine Science, Shandong University, Jinan 250012, China;

⁽³⁾ Department of Cell Biology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract To research the effect of insulin on the expression and activity of the neuronal nitric oxide synthase in neural cells, the effects of insulin on the expression and activity of neuronal nitric oxide synthase were investigated in PC12 cells, by using flow cytometry, *in situ* hybridization and electron spin resonance (ESR) techniques. After incubation with insulin for 9 h, the expression of nNOS protein was significantly increased by insulin in a

concentration-dependent manner, with a maximal increase of about 55% of the control values ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test). The transcription of nNOS was also significantly increased by insulin (16 mU/L, 6 h), reaching (182 ± 13)% of the control values ($P < 0.01$, $n = 3$, t -test). In addition, significant increase of the activity of nNOS in PC12 cells was also detected after incubation with insulin (16 mU/L) for 9 h, with an increase of 67% of the control values ($P < 0.01$, $n = 4$, t -test). It can be concluded that insulin can upregulate the expression and activity of neuronal nitric oxide synthase in PC12 cells.

Key words insulin, neuronal nitric oxide synthase, flow cytometry, *in situ* hybridization, ESR, PC12 cells

* Corresponding author. Tel: 86-10-62091517, Fax: 86-10-62092724, E-mail: zdsljf@bjmu.edu.cn
Received: April 3, 2003 Accepted: June 23, 2003

科学出版社生物类图书精品推荐

书名	作（译）者	定价/元	出版时间	备 注
生物入侵：数据集成、数量分析与预警	徐汝梅	56	2003 年 9 月	本书围绕对生物入侵的预警，按照监测、数据集成、数据库的建立、对入侵规律的探索、适生区分析、风险评估、模型预测等进行了深入的讨论。收录了相关的管理法规及植物检疫对象名录，便于广大读者查询。
生物入侵：理论与实践	徐汝梅 叶万辉	40	2003 年 8 月	本书从理论和实践两个方面详细、系统地介绍了“生物入侵”的概念、特征及防治措施。
高级植物营养学	廖红 严小龙	48	2003 年 8 月	本书系统地介绍了植物营养元素的种类，以及在农业生态系统中的循环规律、植物对营养物质的吸收运输过程及其调控机制、必需营养元素的生理功能及其分子生物学基础、植物适应养分缺乏和元素毒害的机制、植物营养性状的遗传特性及其遗传改良途径等。
植物病原菌抗药性分子生物学	杨谦	25	2003 年 9 月	本书从植物病原菌对杀菌剂抗药性的基本概念、抗药性形成与发展的分子生物学、抗药性机制的分子生物学、抗药性治理的分子生物学原理、抗药性利用的分子生物学、抗药性的研究方法等方面进行了较为全面和系统的论述。
SARS 与突发公共卫生事件应对策略	郑力	46	2003 年 9 月	本书采用情报学研究方法，运用基础医学、临床医学、预防医学、药学、卫生经济学及管理学等学科知识，研究 SARS 病原学、流行病学、预防与控制、临床诊断与治疗及其相关的卫生装备问题，重点探讨由 SARS 引发的我国公共卫生体制、医学科研和医疗机构运作模式等问题。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）。
邮购地址：100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社
联系人：阮 苾 联系电话：010-64034622（带传真）
欢迎访问生命科学图书网站 <http://www.lifescience.com.cn>