

GLP-1 (1~37) 诱导人类胚胎小肠上皮细胞表达胰岛素 *

杨立业 黄天华 **

(汕头大学医学院生殖医学研究中心, 汕头 515041)

摘要 胶原酶消化法分离培养人类胚胎小肠的上皮细胞, 应用胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1 (1~37), GLP-1) 诱导小肠上皮细胞向胰岛素分泌细胞分化, 免疫组化方法对分化的和未分化的细胞进行鉴定, RT-PCR 检测胰岛内分泌细胞相关基因的表达. 结果成功分离培养出人类小肠上皮细胞, 免疫组化证明细胞表达小肠上皮的标志物细胞角蛋白 18 和 19, 同时细胞也表达胰高血糖素和生长抑素, 但无胰岛素表达. GLP-1(1~37)诱导小肠上皮细胞 6 天, RT-PCR 显示胰十二指肠同源异型基因盒 1 (pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1)、葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter-2, GLUT-2) 和胰岛素基因均有表达, 免疫组化也检测到胰岛素阳性小肠上皮细胞. 未用 GLP-1(1~37)诱导小肠上皮细胞为对照的 RT-PCR 显示 PDX-1、GLUT-2 也表达, 但无胰岛素 mRNA 和蛋白质的表达. 研究表明 GLP-1(1~37)能够诱导人类胚胎小肠上皮细胞向胰岛素分泌细胞分化.

关键词 胰高血糖素样肽 1, 小肠上皮细胞, 分化, 胰岛素, 糖尿病

学科分类号 R35, R74

胰高血糖素样肽 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是前胰高血糖素分子衍生的一种激素, 属于肠肽激素, 主要由末端空肠、回肠和结肠的朗罕氏细胞所分泌, 是胰高血糖素原基因(proglucagon)翻译后的加工产物, 它和胃抑肽被称为葡萄糖依赖的促胰岛素分泌肽, 葡萄糖刺激后肠降血糖素的大部分作用都是它们完成的. GLP-1(1~37)酶解去掉 N 端的 6 肽和 C 端酰胺化后即生成具有高度活性的 GLP-1 (7~36)NH₂^[1]. GLP-1 (7~36)NH₂ 是人体内 GLP-1 的自然形式, 其促进胰岛素分泌的作用在 GLP-1 肽中最强. 另外发现有少量 GLP-1(7~37)的存在, 具有相同的生理功能. 一般认为, GLP-1 (1~37)全肽无生物活性. 但最近的研究证明, 小鼠小肠上皮细胞在 GLP-1(1~37)的诱导下能够分化为分泌胰岛素的细胞, 移植到体内能够降低动物模型的高血糖^[2]. 我们研究 GLP-1(1~37)对人类小肠上皮细胞的诱导分化作用, 为 GLP-1(1~37)用于人类糖尿病的治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM/F12 (1:1) 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、谷氨酰胺、胰岛素、地塞米松、烟酰胺、β- 巯基乙醇、青霉素和链霉素均为 GIBCO/BRL 公司产品; 氟康唑为广州南新药业有限公司产品; 鼠抗波形蛋白单克隆抗体(1:200, 武

汉博士德公司); 鼠抗细胞角蛋白 18 (cytokeratin18, CK18) 和细胞角蛋白 19 (cytokeratin19, CK19)单克隆抗体(1:100, 北京中山公司); 鼠胰岛素单克隆抗体 (1:100, 北京中山公司); 鼠抗生长抑素 (somatostatin)单克隆抗体 (1:100, 北京中山公司); 鼠抗平滑肌肌动蛋白 (SMA)单克隆抗体 (1:100, 北京中山公司); 鼠抗胰高血糖素(glucagon)单克隆抗体 (1:100, 北京中山公司); GLP-1(1~37)为 Sigma 公司产品; SP-9000 试剂盒和 AEC 为北京中山公司产品; 培养皿为 Corning 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 小肠上皮细胞的培养. 取胎龄为 10~13 周的人类胚胎小肠组织, 胚胎组织的获取得到病人家属同意及潮州市中心医院伦理委员会的批准, 所有组织均来源于潮州市中心医院妇产科. 由于胚胎胎龄小, 难以区分小肠和大肠组织, 因此我们取所有肠组织的上段 3/5 进行培养, 这些组织中不会含有结肠组织. 小肠组织在无菌条件下切取, 用剪刀剪碎, 加入 0.075% 胶原酶 37℃ 消化 10 min, 加入 DMEM/10%FBS 培养基终止消化, 吸管反复吹打分散细胞, 800 g 离心 5 min, 弃上清, 分离的细胞种植在培养皿培养, 培养基的成分为: DMEM/F12

*广东省自然科学基金资助项目(020001, 012452, 04007929).

** 通讯联系人.

Tel: 0754-8900442, E-mail: thhuang@stu.edu.cn; yangleeyee@sina.com

收稿日期: 2005-01-04, 接受日期: 2005-02-28

(1 : 1), 加入 10% FBS, 1 mg/L 胰岛素, 1×10^{-7} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L 烟酰胺, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 μ mol/L β - 巯基乙醇, 100 U/ml 青霉素, 100 g/L 链霉素和 1 mg/L 氟康唑。细胞种植密度约为 5 000 ~ 10 000 个 /cm²。

1.2.2 细胞的诱导分化. 原代细胞培养 24 h, 培养基中加入 20 nmol/L GLP-1(1~37), 隔 2 天换一次培养基, 培养基中的成分与以上所述相同, 含有 20 nmol/L GLP-1(1~37), 细胞原代培养 6 天后, 进行免疫细胞化学检查。对照组中的细胞培养基不含有 GLP-1(1~37), 其他成分相同。

1.2.3 免疫细胞化学检查. 未诱导分化的细胞 (对照组) 和诱导分化的细胞在培养皿上进行免疫细胞化学检查。0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去培养液, 0.4% 的多聚甲醛固定 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 0.25% Triton X-100 处理 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 含有 1% 马血清的一抗 37℃ 处理 1.5 h, 4℃ 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 以后的染色步骤按 SP-9000 试剂盒说明书进行, AEC 显色, 常规在显微镜下观察照相。

1.2.4 RT-PCR. GLP-1 诱导分化 6 天的细胞和未诱

导分化培养 7 天的细胞的 RNA 提取在常规条件下进行, RT-PCR 所用的引物由大连宝生物公司合成。PDX-1: 5' GGATGAAGTCTACCAAAGCTCAGC 3', 5' CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC 3', PCR 产物长度为 218 bp; Insulin: 5' TCACACCTGGTGGAAGCTC 3', 5' ACAATGCCACGCTTCTGC 3', PCR 产物长度为 179 bp; Glut-2: 5' GCAGCTGCTCAACTAATCAC 3', 5' TCAGCAGCACAAGTCCCACT3', PCR 产物长度为 909 bp; Beta-actin: 5' TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC 3', 5' GCACAGCTTCTCCTTAATGTACGCGC 3', PCR 产物长度为 396 bp。

RT-PCR 反应常规进行, PCR 反应条件: 首次变性 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 51℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 36 个循环。最后延伸 72℃ 10 min。beta-actin 为对照, PCR 产物琼脂糖电泳照相。

2 结 果

原代分离的小肠上皮细胞大部分都成团块状 (图 1a), 有少数细胞被分离成单细胞, 其中包括间充质细胞成分。如果消化时间过长 (超过 20 min),

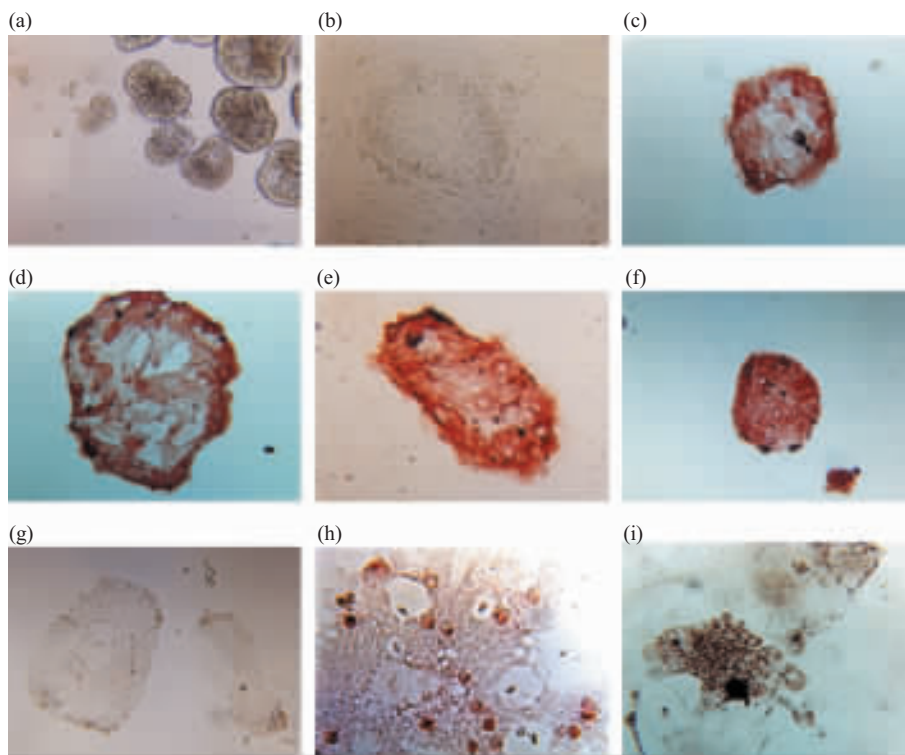


Fig.1 The isolation, culture, identification of intestinal epithelial cells and their differentiation into insulin-positive cells

(a) Primary isolated intestinal epithelial cells were in the shape of aggregation, and single cell was scarce (100 $\times$, phase microscopy). (b) Isolated intestinal epithelial cells were adherent after 7 days culture and they were surrounded by fibroblast-like stromal cells (100 $\times$, phase microscopy). (c) Intestinal epithelial cells were positive for CK18 (100 $\times$). (d) Intestinal epithelial cells were positive for CK19 (100 $\times$). (e) Intestinal epithelial cells were positive for somatostatin (100 $\times$). (f) Intestinal epithelial cells were positive for glucagons (100 $\times$). (g) Intestinal epithelial cells of no GLP-1 induction were not stained by anti-insulin (100 $\times$). (h) Scattered intestinal epithelial cells were positive for insulin induced by GLP-1 for 6 days (100 $\times$). (i) A colony of intestinal epithelial cells were positive insulin induced by GLP-1 for 6 days (100 $\times$).

则小肠上皮细胞都分散为单细胞. 在培养 24 h 后, 小肠上皮细胞贴壁, 但不增殖. 培养 7 天, 可见围绕小肠上皮细胞增殖细胞为集落样生长的基质细胞, 成纤维细胞形态 (图 1b). 肠上皮细胞培养时间超过 12 天, 成片状的小肠上皮细胞逐渐脱离底壁, 最终死亡. 免疫细胞化学检测证明, 小肠上皮细胞表达 CK18 (图 1c) 和 CK19 (图 1d), 同时也表达胰

岛内分泌细胞分泌的激素生长抑素 (图 1e) 和胰高血糖素 (图 1f). 未检测到胰岛素的表达 (图 1g). 而分散生长的成纤维细胞样的小肠基质细胞表达波形蛋白, 不表达 CK18、CK19、胰岛素和胰高血糖素 (未显数据). RT-PCR 检查发现, 培养细胞表达胰岛素发育相关基因 PDX-1、Glut-2 和对照 beta-actin, 但无胰岛素 mRNA 表达 (图 2).

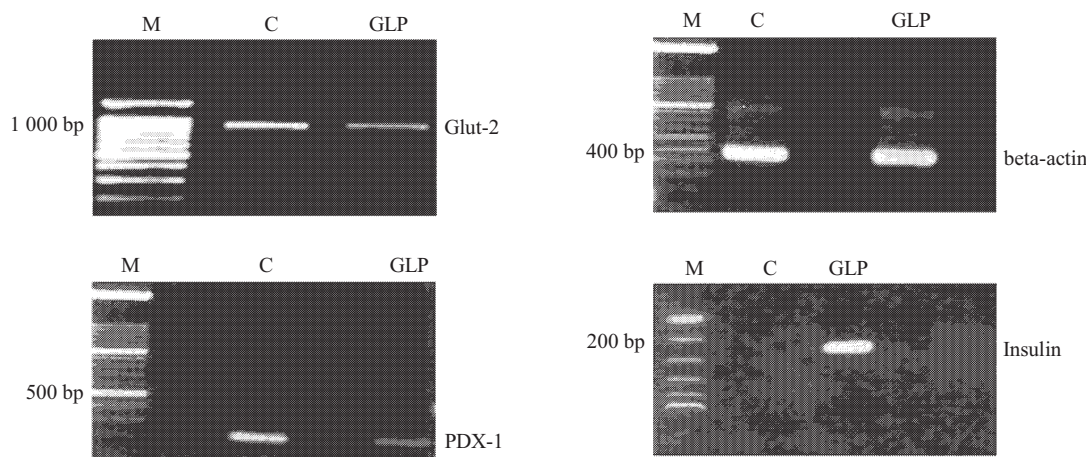


Fig.2 RT-PCR analysis of insulin and gene associated with pancreas development

The figure showed that insulin mRNA expression could be detected after glucagon-like peptide 1(1~37) induction controlled with no GLP-1 induction, and Glut-2, beta-actin and PDX-1 mRNA could be detected both in GLP-1 induction and no GLP-1 induction. M: marker, GLP: glucagon-like peptide 1, C: control.

原代培养 24 h, 培养基中加入 GLP-1(1~37)诱导分化 6 天, 免疫细胞化学检查, 在小肠的上皮细胞中, 仍能检测到 CK18、CK19、生长抑素和胰高血糖素的表达. 而在分散的 (图 1h) 和片状生长的 (图 1i) 小肠上皮细胞中, 可以检测到胰岛素的表达, 阳性部位在细胞浆中, 细胞膜和细胞核无表达, 阳性细胞部位显红色. RT-PCR 检测发现: 分化细胞不但表达 PDX-1、Glut-2、beta-actin, 而且胰岛素 mRNA 也表达 (图 2). 从胎龄 10 周到 13 周的胚胎小肠上皮细胞都可以诱导分化得到胰岛素阳性细胞. 大体观察, 胰岛素阳性细胞在小肠上皮细胞的比例在不同的实验中差别较大, 最低为 10% 左右, 最高可达 40%. 如果细胞体外培养 6 天, 不加入 GLP-1(1~37)诱导, 则小肠上皮细胞中无胰岛素阳性细胞 (图 1h). 如果将小肠上皮细胞在体外培养 5 天, 然后在培养基中加入 GLP-1(1~37)诱导 5 天, 小肠上皮细胞中无胰岛素阳性细胞.

3 讨 论

在胚胎发育阶段, 小肠和胰腺都起源于前肠, 胰腺最初是十二指肠两边的两个分开的突起, 称为腹芽和背芽. 腹芽和背芽独立地生长, 每个芽中都含有内分泌和外分泌的组织成分. 随着发育的进行, 胃和十二指肠发生旋转, 使两芽接触, 随后在接触点融合形成胰腺. 胰腺的内分泌细胞形成细胞簇, 称为 Langerhans 岛. 由于胰岛内分泌细胞和小肠上皮细胞的共同起源, 它们在发育阶段的共性, 提示发育阶段的小肠上皮细胞有分化为胰岛素分泌细胞的可能. 近期对小鼠的研究证明, GLP-1(1~37)能够诱导小鼠小肠上皮细胞分化为分泌胰岛素的细胞, 这种细胞可以对高血糖的刺激发生反应, 分泌胰岛素, 细胞移植到糖尿病鼠模型体内, 能够改善动物的疾病症状^[2]. 但由于人与小鼠是属于不同的种属, 人类的小肠上皮细胞是否也能够分化为胰岛素分泌细胞, 目前尚无报告.

我们研究证明, 人类小肠上皮细胞表达 CK18 和 CK19, 这两种细胞角蛋白在胰腺的上皮细胞均有表达, 在小肠上皮细胞也表达部分胰腺内分泌细胞的标志物, 如生长抑素和胰高血糖素, 证明了胰腺和小肠在发育阶段的同源性. 原代培养的小肠上皮细胞无胰岛素表达, 而经 GLP-1(1~37)诱导后小肠上皮细胞中出现胰岛素表达, 是由于 GLP-1(1~37)诱导小肠上皮前体 / 干细胞分化为胰岛素阳性细胞. 有研究报告在细胞培养条件下, 细胞可能吸收培养基中的胰岛素而使部分细胞的胰岛素在蛋白质水平表达^[1]. 我们在研究中设立了对照, 免疫细胞化学染色发现小肠上皮细胞胰岛素的表达. PDX-1 和 Glut-2 是胰腺发育相关的基因, 我们同时应用 RT-PCR 技术发现这两种基因和胰岛素基因 mRNA 的表达, 验证了实验结果的正确性. 如果将小肠上皮细胞在体外培养 5 天, 然后在培养基中加入 GLP-1(1~37)诱导 5 天, 小肠上皮细胞中无胰岛素阳性细胞. 可能由于体外培养 5 天后, 小肠上皮前体 / 干细胞已经分化为终末的表皮细胞, 因此丧失了向胰岛素分泌细胞的分化能力.

2 型糖尿病的主要病理表现为胰岛素抵抗和由胰岛细胞功能失调所致的胰岛素分泌相对不足, 形成持久的高血糖. 目前的治疗方法尚不能涵盖该疾病所涉及的所有代谢性缺陷, 因而研究者在努力寻找能提高胰岛素敏感性, 促进糖和脂质代谢或增加葡萄糖依赖性胰岛素分泌的新药^[4]. GLP-1 (7~36)NH₂ 是人体内 GLP-1 的自然形式, GLP-1 的功能由 GLP-1 R (glucagon-like peptide-1 receptor) 介导. GLP-1(7~36)NH₂ 直接通过刺激血糖依赖性胰岛素之持续分泌^[5]; 目前已有 GLP-1 类似物进入治疗 2

型糖尿病的 III 期临床试验^[6]. 以前的研究认为 GLP-1 (1~37)全肽无生物活性, 我们研究证实, GLP-1 (1~37)对于人类发育阶段的小肠上皮细胞有促进向胰岛素分泌细胞的诱导作用. 这种小肠上皮细胞来源的细胞是否与胰岛 β 细胞具有相同的生物活性, 如: a. 是否对高血糖的刺激发生反应, 释放胰岛素; b. 移植到糖尿病动物模型的体内是否能够降低血糖, 对糖尿病起治疗作用; c. 成年动物和人类应用 GLP-1(1~37)是否能够诱导成年小肠上皮的前体 / 干细胞分泌胰岛素. 如果深入的研究能够证明以上 3 个假设, 那么, GLP-1(1~37)可能成为治疗糖尿病的一种有潜力开发的新药.

参考文献

- 1 Drucker D J. Minireview: the glucagons-like peptides. *Endocrinology*, 2001, **142** (2): 521~527
- 2 Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (9): 5034~5039
- 3 Rajagopal J, Anderson W J, Kume S, *et al.* Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science*, 2003, **299** (5605): 363.
- 4 Lenhard J M, Gottschalk W K. Preclinical developments in type 2 diabetes. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54** (9): 1199~1212
- 5 Holz G G, Leech C A, Heller R S, *et al.* cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagons like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem*, 1999, **274** (20): 14147~14156
- 6 Egan J M, Clocquet A R, Elahi D. The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87** (3): 1282~1290

Glucagon-like Peptide 1 (1~37) Induces Human Embryonic Intestinal Epithelial Cells Into Insulin-positive Cells*

YANG Li-Ye, HUANG Tian-Hua**

(Research Center for Reproductive Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

Abstract Human embryonic intestinal tissues were digested by collagenase, epithelial cells were cultured, glucagon-like peptide 1(1~37) was adapted to induce human embryonic intestinal epithelial cells (hEIECs) to differentiate, and hEIECs without GLP-1 induction were set as control. hEIECs were successfully isolated and cultured, they were stained by cytokeratin 18 and cytokeratin19, the marker for intestinal epithelial cells; they were also stained by somatostatin and glucagon, the hormones secreted by endocrinal cells from pancreas, but they were

negative for insulin. After GLP-1(1~37) induction for 6 days, insulin-positive cells could be identified in intestinal epithelial cells by immunocytochemistry and RT-PCR showed that these cells expressed pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), glucose transporter-2 (GLUT-2) and insulin. No insulin-positive cells were identified in the control (no GLP-1(1~37) induction), RT-PCR showed that the control expressed PDX-1 and GLUT-2, but not insulin. The findings suggest that GLP-1(1~37) could induce insulin production in developing human embryonic intestinal epithelial cells *in vitro*, and GLP-1(1~37) may represent a new therapeutic approach to diabetes mellitus.

Key words glucagon-like peptide 1(GLP-1), intestinal epithelial cells, differentiation, insulin, diabetes

*This work was supported by a grant from The Natural Sciences Foundation of Guangdong Province (012452, 20001, 04007929).

**Corresponding author . Tel: 86-754-8900442, E-mail: thhuang@stu.edu.cn; yangleeyee@sina.com

Received: January 4, 2005 Accepted: February 28, 2005