

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0679

• 短篇论著 •

胃饥饿素通过 cAMP/PKA 通路对胰高血糖素样肽 1 促胰岛素分泌功能的影响

王一凡, 王强, 张伟, 仇明*

第二军医大学长征医院普外三科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨胃饥饿素(ghrelin)能否通过调控环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cAMP/PKA)通路竞争性抑制胰高血糖素样肽 1(GLP-1)的促胰岛素分泌效应。**方法** 取 8~10 周龄雄性 SD 大鼠 5 只,分离、纯化大鼠胰岛,经双硫脲(DTZ)和吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色鉴定后,每只大鼠挑选 60 个胰岛,将其随机分成 6 组并接受不同处理: S₀ 组(8.3 mmol/L 葡萄糖溶液)、S₁ 组(8.3 mmol/L 葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1)、S₂ 组(8.3 mmol/L 葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin)、S₃ 组[8.3 mmol/L 葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+1 μmol/L 生长激素促泌素受体 1α(GHSR-1α)拮抗剂生长激素释放肽 6(D-Lys³-GHRP-6)]、S₄ 组(8.3 mmol/L 葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+5 μmol/L 腺苷酸环化酶激动剂毛喉素)、S₅ 组(8.3 mmol/L 葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+10 μmol/L PKA 激动剂 6-Phe-cAMP);所有试剂均于前一试剂处理 10 min 后依次加入后一试剂共同处理,每组胰岛的所有处理时间共 3 h。采用 ELISA 法检测各组胰岛培养液中胰岛素和 cAMP 的浓度。**结果** S₁ 组胰岛细胞分泌胰岛素和释放 cAMP 的浓度均高于 S₀ 组(*P* 均<0.05),S₂ 组均低于 S₁ 组(*P* 均<0.05)。S₃、S₄ 和 S₅ 组胰岛细胞分泌胰岛素和释放 cAMP 的浓度均高于 S₂ 组(*P* 均<0.05)。**结论** Ghrelin 能够抑制 GLP-1 的促胰岛素分泌效应,其作用机制可能是通过 cAMP/PKA 通路竞争性抑制 GLP-1 的促分泌效应。

[关键词] 胃饥饿素;胰高血糖素样肽 1;环磷酸腺苷;胰岛素;胰岛

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0679-04

Effect of ghrelin on function of glucagon-like peptide 1 stimulating secretion of insulin through cAMP/PKA pathway

WANG Yi-fan, WANG Qiang, ZHANG Wei, QIU Ming*

Department of General Surgery (III), Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore whether ghrelin can competitively inhibit glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to stimulate the secretion of insulin via cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway. **Methods** The pancreatic islets were isolated and purified from five 8-10 weeks old male SD rats, and identified by dithizone (DTZ) and acridine orange (AO)/propidium iodide (PI) staining. Sixty pancreatic islets were selected from each rat and then randomly divided into six groups for different disposals: S₀ group (8.3 mmol/L glucose solution), S₁ group (8.3 mmol/L glucose solution+10 nmol/L GLP-1), S₂ group (8.3 mmol/L glucose solution+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin), S₃ group (8.3 mmol/L glucose solution+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+1 μmol/L growth hormone-releasing peptide 6 [D-Lys³-GHRP-6]), an antagonist of growth hormone secretagogue receptor 1α [GHSR-1α], S₄ group (8.3 mmol/L glucose solution + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin + 5 μmol/L forskolin, an adenylate cyclase activator), and S₅ group (8.3 mmol/L glucose solution + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin + 10 μmol/L 6-Phe-cAMP, a PKA activator); all reagents were added after last reagent treatment for 10 min. Each group had a disposal of three hours totally. ELISA assay was used to detect the concentrations of insulin and cAMP. **Results** The concentrations of insulin and cAMP in S₁ group were significantly higher than those in S₀ group (all *P*<0.05);

[收稿日期] 2017-02-26 **[接受日期]** 2017-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81270969, 81370984),上海市自然科学基金(12ZR1439100). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270969, 81370984) and Natural Science Foundation of Shanghai (12ZR1439100).

[作者简介] 王一凡,第二军医大学临床医学专业八年制 2009 级学员。E-mail: wyfshejyd@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885806, E-mail: qium127@163.com

their concentrations in S₂ group were significantly lower than those in S₁ group (both $P < 0.05$). The concentrations of insulin and cAMP in S₃, S₄, and S₅ groups were significantly higher than those in S₂ group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ghrelin can inhibit the effect of GLP-1 in promoting secretion of insulin, which may be mediated by cAMP/PKA pathway.

[Key words] ghrelin; glucagon-like peptide 1; cyclic AMP; insulin; islets of Langerhans

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 679-682]

代谢手术作为2型糖尿病的治疗方法之一,可影响胃肠道多种激素的水平^[1-2],代谢手术在糖尿病发生、发展过程中对激素水平及其受体功能有着重要影响。因此阐明其影响机制对临床治疗糖尿病药物的探索具有重要意义。代谢手术“后肠假说”的代表激素是胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1, GLP-1),它可以激活环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)通路。该信号通路参与调控胰岛β细胞分泌胰岛素,从而维持血糖稳定^[3-4];袖状胃切除术具有一定的降血糖效果,主要是通过降低胃底分泌的胃饥饿素(ghrelin)来发挥作用^[5-6]。有研究表明ghrelin通过生长激素促泌素受体1α(growth hormone secretagogue receptor 1α, GHSR-1α)竞争性抑制GLP-1刺激胰岛β细胞的促胰岛素分泌效应^[7]。但ghrelin对竞争性抑制GLP-1促胰岛素分泌效应的竞争性抑制作用的具体机制尚不清楚,其是否与cAMP/PKA通路直接关联也无明确的研究报道,因此,本研究旨在探索ghrelin是否通过cAMP/PKA通路竞争性抑制GLP-1对胰岛细胞分泌胰岛素的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料 5只8~10周龄250~300g SPF级成年雄性SD大鼠由第二军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。GLP-1、GHSR-1α拮抗剂生长激素释放肽6(D-Lys³-GHRP-6)、腺苷酸环化酶激动剂毛喉素(forskolin)、PKA激动剂(6-Phe-cAMP)和ghrelin均购自美国Sigma公司。RPMI 1640培养基(货号:R10-040-CV,美国Corning公司);大鼠胰岛素ELISA检测试剂盒(货号:10-1250-01,瑞典Mercodia公司);cAMP ELISA检测试剂盒(货号:20161226,南京建成生物工程研究所)。RT-2100C型酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 双硫腍(DTZ)染色 分离、纯化胰岛^[8],体外

培养48h进行DTZ染色。将10mg DTZ溶于10mL DMSO中,用pH 7.8的Hank's液1:1 000稀释,经0.22 μm孔径滤膜过滤,然后与胰岛混合,室温染色10min后采用光学显微镜观察胰岛形态。

1.3 吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色 用Hank's液配制储存液:AO 670 μmol/L、PI 750 μmol/L,4℃避光保存。将0.01 mL AO、1 mL PI储存液混合,用Hank's液稀释10倍,0.22 μm孔径滤膜过滤,与胰岛混合10min后,于荧光显微镜下观察胰岛生长状态。

1.4 实验分组与处理 在显微镜下挑选形态饱满、直径为100 μm的胰岛。每只大鼠挑选60个胰岛,随机分入6组并接受不同处理。S₀组(8.3 mmol/L葡萄糖溶液)、S₁组(8.3 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L^[9] GLP-1)、S₂组(8.3 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L^[9] ghrelin)、S₃组[8.3 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+1 μmol/L^[9] D-Lys³-GHRP-6]、S₄组(8.3 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+5 μmol/L^[10] forskolin)、S₅组(8.3 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L GLP-1+10 nmol/L ghrelin+10 μmol/L^[10] 6-Phe-cAMP);所有试剂均于前一试剂处理10min后依次加入后一试剂共同处理。每10个胰岛放入1个1.5 mL离心管中,加入300 μL含相应浓度试剂的KRBH培养液(KRBH培养液购自美国Sigma公司;使用时添加1 mg/mL小牛血清白蛋白),于37℃、5% CO₂条件下培养3h。

1.5 ELISA法检测胰岛素及cAMP浓度 吸取上清250 μL于新的离心管中,标记后4℃保存。按照大鼠胰岛素ELISA检测试剂盒操作说明处理样本,采用酶标分析仪测定450 nm波长下的光密度(D)值。同时,于原有离心管中加入0.5 mL KRBH培养液,超声波裂解胰岛。37℃ 400×g离心20min后取上清400 μL,按照cAMP ELISA检测试剂盒操

作说明处理样本后,用酶标仪测定 450 nm 波长下的 D 值。根据浓度和 D 值算出标准曲线的回归方程,分别采用三次样条回归模型和 logistic 曲线模型(四参数)计算胰岛素和 cAMP 浓度。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行数据分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同组统计指标给予不同处理的变化比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 DTZ 及 AO/PI 染色结果 分离、纯化后的胰岛被 DTZ 染成猩红色,镜下表现为大小不一的圆形或卵圆形细胞团和散在细胞(图 1A、1B)。胰岛细胞被 AO/PI 染色后,活细胞发出绿色荧光(图 1C、1D)。

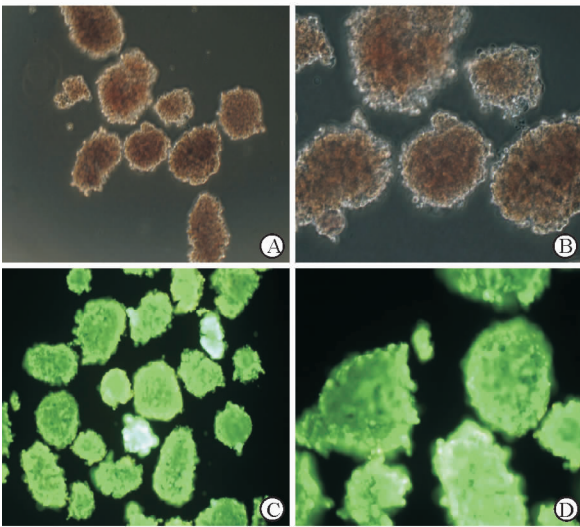


图 1 大鼠胰岛细胞 DTZ 及 AO/PI 染色

A, B: 双硫脲(DTZ)染色; C, D: 吖啶橙(AO)/碘化丙啶(PI)染色。Original magnification: $\times 100$ (A, C), $\times 200$ (B, D)

2.2 Ghrelin 对胰岛素和 cAMP 浓度的影响 由图 2 可见,与对照组(S_0 组)相比,GLP-1(S_1 组)能够促进胰岛素分泌,并上调 cAMP 的浓度($P < 0.05$),而与 ghrelin 同时处理胰岛(S_2 组)可明显抑制 GLP-1 对胰岛素和 cAMP 的上调效应($P < 0.05$)。当 GLP-1、ghrelin 与 GHSR-1 α 拮抗剂 D -Lys³-GHRP-6 联合作用时(S_3 组),结果显示胰岛素与 cAMP 浓度均明显增加,与 GLP-1 和 ghrelin 共同处理(S_2 组)相比差异有统计学意义($P < 0.05$);与 forskolin(S_4 组)或 6-Phe-cAMP(S_5 组)共同处理时,胰岛素和 cAMP 浓度也均高于 S_2 组(P 均 < 0.05)。

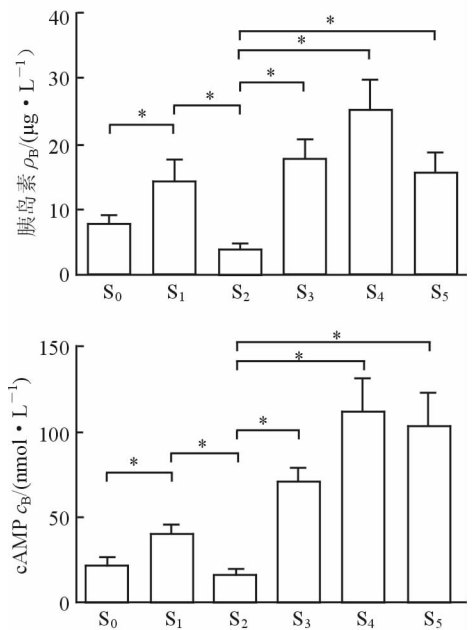


图 2 各组间胰岛细胞分泌胰岛素及释放 cAMP 比较

S_0 组: 8.3 mmol/L 葡萄糖溶液(GS); S_1 组: 8.3 mmol/L GS + 10 nmol/L 胰高血糖素样肽 1(GLP-1); S_2 组: 8.3 mmol/L GS + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin; S_3 组: 8.3 mmol/L GS + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin + 1 $\mu\text{mol/L}$ 生长激素促泌素受体 1 α (GHSR-1 α)拮抗剂生长激素释放肽 6(D -Lys³-GHRP-6); S_4 组: 8.3 mmol/L GS + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin + 5 $\mu\text{mol/L}$ 腺苷酸环化酶激动剂毛喉素(forskolin); S_5 组: 8.3 mmol/L GS + 10 nmol/L GLP-1 + 10 nmol/L ghrelin + 10 $\mu\text{mol/L}$ PKA 激动剂 6-Phe-cAMP。cAMP: 环磷酸腺苷。* $P < 0.05$, $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

研究发现,摄食后 GLP-1 释放到循环中的浓度增加,禁食使得胰高血糖素原 1 和 2 表达均下降^[11],还发现 GLP-1 的肠促胰岛素作用在 2 型糖尿病患者体内有所减弱^[12];而循环 ghrelin 的浓度在餐前增加,在餐后下降^[13],低血清 ghrelin 水平有助于改善机体糖代谢、胰岛素抵抗和肥胖,高血清 ghrelin 水平在胰岛中能够抑制胰岛素分泌,在中枢能显著增加摄食量^[14]。可见 GLP-1 和 ghrelin 对于机体的糖代谢和胰岛素分泌存在一定的“相反性”。本研究也显示 ghrelin 可以拮抗 GLP-1 促胰岛素分泌的效应。

研究表明,cAMP/PKA 通路在调控胰岛分泌胰岛素过程中发挥重要作用^[9]。Ghrelin 可通过抑制 cAMP/PKA 通路进而抑制胰岛素的分泌^[15]。本研究结果显示,在 8.3 mmol/L 葡萄糖状态下,GLP-1

促进了胰岛素的分泌和 cAMP 的释放,而 ghrelin 可以拮抗 GLP-1 的这种促进效应;但在给予 ghrelin 的主要结合受体 GHSR-1 α 的拮抗剂 D-Lys³-GHRP-6 时,其胰岛素分泌和 cAMP 释放又明显增加。GLP-1、ghrelin 共同处理胰岛释放 cAMP 的浓度明显低于其与 forskolin 或 6-Phe-cAMP 共同作用时的浓度。因此,我们得出结论:ghrelin 能够抑制 GLP-1 的促胰岛素分泌效应,其作用机制可能是通过 cAMP/PKA 通路竞争性抑制 GLP-1 的促分泌效应。该结论为临床实践中治疗糖尿病提供了新的思路,即可以在阻断 ghrelin 的同时激活 GLP-1,增加 cAMP 的释放,促进胰岛素分泌,从而达到治疗糖尿病的目的。

本研究仅在体外水平验证了 ghrelin 对 GLP-1 的促胰岛素分泌效应的拮抗作用,并探讨了与 cAMP/PKA 通路相关的可能机制,由于胰岛素分泌涉及的影响因素较多,排除其他因素对 GLP-1 和 ghrelin 的影响难度较大,故本研究并未开展体内实验。本研究虽只有体外实验结果,但可为后续体内研究提供科研思路,有助于进一步探究激素在体内内外作用的差异。

[参考文献]

[1] NARAYANASWAMI V, DWOSKIN L P. Obesity: current and potential pharmacotherapeutics and targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 170: 116-147.

[2] FAERCH K, HULMÁN A, SOLOMON T P. Heterogeneity of pre-diabetes and type 2 diabetes: implications for prediction, prevention and treatment responsiveness[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2016, 12: 30-41.

[3] SECHER A, JELSING J, BAQUERO A F, HECKSHER-SØRENSEN J, COWLEY M A, DALBØGE L S, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124: 4473-4488.

[4] SALEHI M, GASTALDELLI A, D'ALESSIO D A. Blockade of glucagon-like peptide 1 receptor corrects postprandial hypoglycemia after gastric bypass[J/OL]. *Gastroenterology*, 2014, 146: 669-680. e2. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.044.

[5] LEE J H, NGUYEN Q N, LE Q A. Comparative effectiveness of 3 bariatric surgery procedures: Roux-en-Y gastric bypass, laparoscopic adjustable gastric band, and sleeve gastrectomy[J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2016, 12: 997-1002.

[6] MARTINUSSEN C, BOJSEN-MØLLER K N, DIRKSEN C, JACOBSEN S H, JØRGENSEN N B, KRISTIANSEN V B, et al. Immediate enhancement of first-phase insulin secretion and unchanged glucose effectiveness in patients with type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308: E535-E544.

[7] GE G H, DOU H J, YANG S S, MA J W, CHENG W B, QIAO Z Y, et al. Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular endothelial cells injured by high glucose[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8: 73-78.

[8] CARTER J D, DULA S B, CORBIN K L, WU R, NUNEMAKER C S. A practical guide to rodent islet isolation and assessment [J]. *Biol Proced Online*, 2009, 11: 3-31.

[9] DAMDINDORJ B, DEZAKI K, KURASHINA T, SONE H, RITA R, KAKEI M, et al. Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet β -cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586: 2555-2562.

[10] KONG X, YAN D, WU X, GUAN Y, MA X. Glucotoxicity inhibits cAMP-protein kinase A-potentiated glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells[J]. *J Diabetes*, 2015, 7: 378-385.

[11] HOYT E C, LUND P K, WINESETT D E, FULLER C R, GHATEI M A, BLOOM S R, et al. Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum [J]. *Diabetes*, 1996, 45: 434-439.

[12] KJEMS L L, HOLST J J, VOLUND A, MADSBAD S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on β -cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects[J]. *Diabetes*, 2003, 52: 380-386.

[13] CUMMINGS D E, PURNELL J Q, FRAYO R S, SCHMIDOVA K, WISSE B E, WEIGLE D S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans[J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1714-1719.

[14] YADA T, DEZAKI K, SONE H, KOIZUMI M, DAMDINDORJ B, NAKATA M, et al. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2008, 4: 18-23.

[15] DEZAKI K, DAMDINDORJ B, SONE H, DYACHOK O, TENGHOLM A, GYLFE E, et al. Ghrelin attenuates cAMP-PKA signaling to evoke insulinostatic cascade in islet β -cells [J]. *Diabetes*, 2011, 60: 2315-2324.