

[文章编号] 1674-8115(2011)01-0001-04

· 论著 ·

硫酸脱氢表雄酮对 MIN6 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响

岳江, 刘伟, 李圣贤, 王丽华

(上海交通大学医学院附属仁济医院内分泌代谢病科, 上海 200127)

[摘要] 目的 探讨硫酸脱氢表雄酮(DHEAS)对胰岛 β 细胞株MIN6葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响。方法 以葡萄糖刺激浓度为2.8 mmol/L和16.7 mmol/L的对数生长期MIN6细胞作为实验对象, 分别以1、5、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS干预10 min和24 h(不同浓度DHEAS组), 以5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS或与10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 糖皮质激素受体阻断剂RU486联合干预24 h(DHEAS+RU486组), 设立空白对照组。ELISA法测定细胞培养上清液中胰岛素分泌量, Real-Time PCR检测细胞胰岛素mRNA表达。结果 干预后10 min和24 h时点, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS组MIN6细胞培养上清液中的胰岛素分泌量均显著高于空白对照组($P < 0.05$); 干预后24 h时点, DHEAS+RU486组与DHEAS组MIN6细胞培养上清液中胰岛素分泌量比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 但均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。干预后24 h时点, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS组MIN6细胞胰岛素mRNA表达均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。结论 DHEAS对MIN6细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌具有促进作用, 且其核内信号通路可能不经糖皮质激素受体介导。

[关键词] 硫酸脱氢表雄酮; 胰岛 β 细胞; 葡萄糖刺激胰岛素分泌

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.01.001

[中图分类号] R711; R587

[文献标志码] A

Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate on glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells

YUE Jiang, LIU Wei, LI Sheng-xian, WANG Li-hua

(Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS) on glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets β cell lines (MIN6). **Methods** MIN6 cells at exponential phase of growth stimulated by glucose (2.8 mmol/L and 16.7 mmol/L) were served as study objectives. Cells were treated by DHEAS (1, 5 and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) for 10 min and 24 h (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group), and DHEAS group (treated by 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS for 24 h) and DHEAS + RU486 group (treated by 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS + 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ glucocorticoid receptor blocker RU486 for 24 h) were divided. Besides, blank control group was established. The insulin secretion in the supernatant was measured by ELISA method, and the expression of insulin mRNA was detected by Real-Time PCR. **Results** After treatment for 10 min and 24 h, the insulin secretion of MIN6 cells in the supernatant in 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group was significantly higher than that in blank control group ($P < 0.05$). After treatment for 24 h, there was no significant difference in insulin secretion of MIN6 cells in the supernatant between DHEAS + RU486 group and DHEAS group ($P > 0.05$), while both were significantly higher than that in blank control group ($P < 0.05$). After treatment for 24 h, the expression of insulin mRNA of MIN6 cells in 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DHEAS group was significantly higher than that in blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The glucose-stimulated insulin secretion of MIN6 cells could be promoted by DHEAS, which may be mediated by an unidentified nuclear receptor but not glucocorticoid receptor.

[Key words] dehydroepiandrosterone-sulfate; pancreatic β cells; glucose-stimulated insulin secretion

[基金项目] 国家自然科学基金(30570882)(National Natural Science Foundation of China, 30570882)。

[作者简介] 岳江(1983—), 男, 硕士生; 电子信箱: yuejiang198366@163.com。

[通信作者] 刘伟, 电子信箱: sue_liuwei@163.com。

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是常见的妇科内分泌疾病, 其发病原因和机制目前仍不明确。研究^[1]表明: PCOS 患者血清硫酸脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone-sulfate, DHEAS) 水平升高, 存在高雄激素血症和高胰岛素血症。高胰岛素血症可能通过以下几方面影响 PCOS 的发生和发展: ①直接刺激卵巢类固醇激素的合成; ②增加卵泡膜细胞对黄体生成素 (LH) 的反应, 分泌过量雄激素; ③抑制肝脏性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 的合成, 使游离雄激素水平升高; ④抑制肝合成胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (insulin-like growth factor binding protein-1, IGFBP-1), 增加胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 的生物利用度; ⑤影响中枢神经系统对促性腺激素分泌的调节作用。

为了进一步阐明 DHEAS 与高胰岛素血症间的关系, 本研究以胰岛 β 细胞株 MIN6 作为实验对象, 观察 DHEAS 对 MIN6 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响, 并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DHEAS (International Laboratory); DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶和青、链霉素 (Gibco); 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma); 胰岛素 ELISA 分析试剂盒 (Millipore); 反转录和 Real-Time PCR 试剂盒 (TaKaRa); PCR 引物 (上海生工生物工程技术服务有限公司); TRIzol 试剂 (Invitrogen); 糖皮质激素受体阻断剂 RU486 (10 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma)。

1.1.2 细胞 胰岛 β 细胞株 MIN6 由上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌代谢病研究所馈赠。细胞用含 4.5 g/L D - 葡萄糖、15% 胎牛血清、3.4 g/L 碳酸氢钠、584 mg/L L - 谷氨酰胺、75 mg/L 青霉素、50 mg/L 链霉素和 10 $\mu\text{L/L}$ β - 糯基乙醇的 DMEM 培养基培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% 空气和 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞处理和分组 取对数生长期的 MIN6 细胞进行实验 (葡萄糖刺激浓度为 2.8 mmol/L 和 16.7 mmol/L), 根据添加干预药物的种类和浓度进行细胞分组。①分组一: 分为不同浓度 DHEAS 组 (添加 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 干预 10 min 和 24 h)、阳性对照组 (20 mmol/L KCl 干预 10 min)、空白对照组 (添加 0.2% DMSO)。②分组二: 分为 DHEAS 组 (5 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 干预 24 h)、RU486 组 (10 $\mu\text{mol/L}$ RU4865 干

预 24 h)、DHEAS + RU486 组 (5 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 与 10 $\mu\text{mol/L}$ RU486 联合干预 24 h) 和空白对照组 (添加 0.2% DMSO)。

1.2.2 MIN6 细胞培养上清中胰岛素含量测定 各组培养细胞每孔吸取 250 μL 上清液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。采用人工计数每孔细胞数, 重复 3 次后取均值。按照 ELISA 分析试剂盒的说明书进行操作。标准曲线批内误差 <5%, 批间误差 <10%。采用人工计数法校正上清液中胰岛素含量后作图分析。

1.2.3 Real-Time PCR 检测 MIN6 细胞胰岛素 mRNA 表达 于干预后 10 min 和 24 h 时点取不同浓度 DHEAS 组 MIN6 细胞, 采用 Real-Time PCR 观察胰岛素基因 mRNA 表达。TRIzol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪测定 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值和总 RNA 浓度。取 1 μg 总 RNA, 经反转录为 cDNA (20 μL 反应体系), -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 Primer Premier 2.0 软件设计胰岛素 mRNA 和内参 β -actin 的 Real-Time PCR 扩增引物, 序列见表 1。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。目标基因胰岛素 mRNA 的相对表达量以目标基因与内参基因循环阈值的差值 (ΔCt) 表示。

表 1 Real-Time PCR 引物序列

Tab 1 Sequence of primers for Real-Time PCR

基因	引物序列 (5'→3')	扩增片段 (bp)
胰岛素 mRNA	上游: TGAAGTGGAGGACCCACAAGTG 下游: TACAATGCCACGGTTCTGCTG	109
内参 β -actin	上游: GAAATCGTGCCTGACATCAAAGAG 下游: CAATAGTGTGATGACCTGGCGTC	103

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

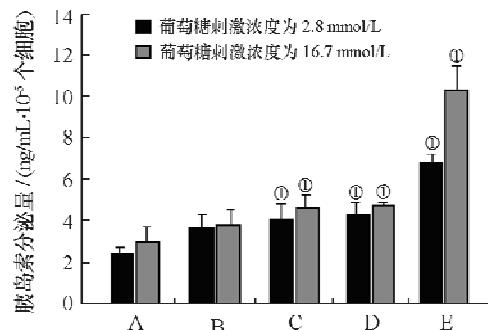
2 结果

2.1 MIN6 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌的变化

2.1.1 不同浓度 DHEAS 干预对胰岛素分泌的影响 干预后 10 min 和 24 h 时点, 当葡萄糖刺激浓度分别为 2.8 mmol/L 和 16.7 mmol/L 时, 各组 MIN6 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌情况见图 1、2。统计学分析表明: 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

2.1.2 DHEAS 与 RU486 联合干预对胰岛素分泌的影响 干预后 24 h 时点, 当葡萄糖刺激浓度分别为

2.8 mmol/L 和 16.7 mmol/L 时, RU486 组 MIN6 细胞胰岛素分泌量与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); DHEAS 组与 DHEAS 组 + RU486 组的 MIN6 细胞胰岛素分泌量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但均明显高于空白对照组 ($P < 0.05$) (图 3)。

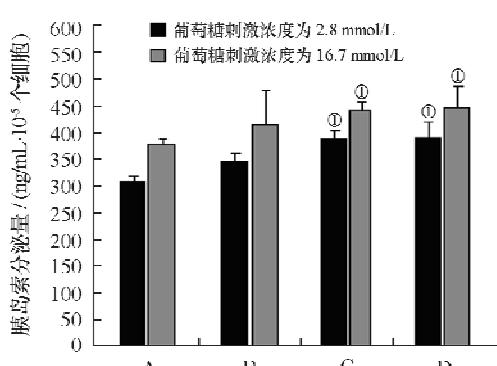


A. 空白对照组; B、C、D. 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 组; E. 阳性对照组。

^① $P < 0.05$ 与空白对照组比较。

图 1 DHEAS 干预 10 min 的 MIN6 细胞胰岛素分泌情况

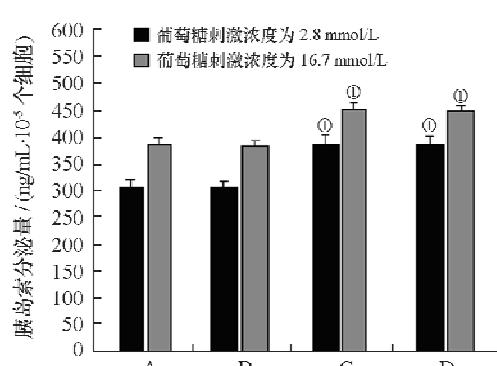
Fig 1 Insulin secretion of MIN6 cells after treatment by DHEAS for 10 min



A. 空白对照组; B、C、D. 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 组。^① $P < 0.05$ 与空白对照组比较。

图 2 DHEAS 干预 24 h 的 MIN6 细胞胰岛素分泌情况

Fig 2 Insulin secretion of MIN6 cells after treatment by DHEAS for 24 h



A. 空白对照组; B. RU486 组; C. DHEAS 组; D. DHEAS 组 + RU486 组。^① $P < 0.05$ 与空白对照组比较。

图 3 DHEAS 与 RU486 干预对 MIN6 细胞胰岛素分泌的影响

Fig 3 Effects of DHEAS and RU486 treatment on insulin secretion of MIN6 cells

2.2 MIN6 细胞葡萄糖刺激的胰岛素 mRNA 表达的变化

Real-Time PCR 检测结果表明:干预期后 10 min 时点,当葡萄糖刺激浓度分别为 2.8 mmol/L 和 16.7 mmol/L 时,各组细胞胰岛素 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);干预期后 24 h 时点,当葡萄糖刺激浓度分别为 2.8 mmol/L 和 16.7 mmol/L 时,5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ DHEAS 组胰岛素 mRNA 相对表达量均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组胰岛素 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, ΔCt)

Tab 2 Comparison of expression of insulin mRNA in each group ($\bar{x} \pm s$, ΔCt)

组别	干预期后 10 min		干预期后 24 h	
	2.8 mmol/L 葡萄糖刺激	16.7 mmol/L 葡萄糖刺激	2.8 mmol/L 葡萄糖刺激	16.7 mmol/L 葡萄糖刺激
空白对照组	5.10 ± 0.24	5.22 ± 0.21	5.65 ± 0.27	6.29 ± 0.73
DHEAS 组				
1 $\mu\text{mol/L}$	5.09 ± 0.29	5.24 ± 0.32	6.46 ± 0.23	6.88 ± 0.76
5 $\mu\text{mol/L}$	5.21 ± 0.17	5.25 ± 0.27	6.49 ± 0.26 ^①	7.45 ± 0.17 ^①
10 $\mu\text{mol/L}$	5.17 ± 0.32	5.23 ± 0.44	6.81 ± 0.52 ^①	8.17 ± 0.46 ^①

^① $P < 0.05$ 与空白对照组比较。

3 讨论

脱氢表雄酮及其硫酸盐 DHEAS 主要是由肾上腺皮质和性腺分泌,是人体血液循环中非常丰富的甾体类激素。临床研究^[2]表明:DHEAS 具有改善葡萄糖耐量和提高机体胰岛素敏感性的作用;脱氢表雄酮还可降低血清总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白水平。DHEAS 有助于提高类固醇激素缺乏或胰岛 β 细胞功能受损患者的胰岛素分泌量和恢复 β 细胞功能。

DHEAS 升高对机体也有不利的一面,如 DHEAS 作为性激素的前体,可代谢生成睾酮,进而导致高雄激素血症,使卵泡不能正常发育甚至闭锁,进而形成 PCOS;PCOS 主要病因之一的肾上腺功能初现 (premature adrenarche, PA) 即以 DHEAS 水平显著升高为主要特点。研究^[3-4]发现:有 PA 史女性的睾酮、性激素结合球蛋白及胰岛素水平与正常对照比较差异具有统计学意义,且可表现出 PCOS 的症状,推测 DHEAS 与 PCOS 的关系密切。升高的血清 DHEAS 水平能够诱发卵泡发生闭锁及囊状扩张卵泡改变,使血睾酮水平升高,促进多囊卵巢和高雄激素血症的发生。雄激素水平升高减少了胰岛素的清除并增加了游离脂肪酸的转化率,从而诱导胰岛素抵抗产生,

形成高胰岛素血症^[5],最终导致恶性循环的形成。

本研究通过体外模拟 PCOS 患者高 DHEAS, 观察其对小鼠 MIN6 细胞胰岛素释放的影响。实验结果显示:DHEAS 在短时相(干预后 10 min 时点)可促进胰岛素分泌,而胰岛素转录无明显增加,提示 DHEAS 可能是通过非基因转录效应机制(non-genomic mechanisms)发挥作用,经胰岛 β 细胞上的膜介导的信号通路促进胰岛素释放;而 DHEAS 干预 24 h 时点,MIN6 细胞胰岛素 mRNA 表达显著上调;提示 DHEAS 可能作用于核受体,通过促进胰岛素基因的转录,进而使胰岛素合成分泌增加。本研究结果显示:加入糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)阻断剂 RU486 的 DHEAS 组 MIN6 细胞胰岛素分泌无明显变化,提示 DHEAS 促进 MIN6 细胞胰岛素的转录可能并不通过 GR 发挥作用。虽然有文献^[6]报道存在 DHEAS 的胞内结合蛋白,但目前仍未分离出 DHEAS 的胞内受体。尽管过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators activated receptor- α , PPAR α)和其他 PPAR 亚型并不是 DHEAS 的直接受体,但 PPAR α 为 DHEAS 在肝内发挥转录活性和过氧化物酶体增殖活性所必需的^[7]。在啮齿类动物的肝脏中,DHEAS 可增强脂质代谢酶和过氧化物酶体的表达和活性;这些脂质代谢酶包括乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-coenzyme A synthetases, ACS)和乙酰辅酶 A 氧化酶(acetyl-coenzyme A oxidase, ACO)^[8]。ACS 可催化长链脂肪酰基-辅酶 A(long-chain acyl-CoA, LC-CoA),LC-CoA 是脂肪合成和 β 氧化的限速酶;ACO 可催化过氧化物酶体中的脂肪酸氧化。Prentki 等^[9]研究结果显示:脂质的代谢产物尤其是胞内 LC-CoA 或其产物是胰岛素分泌过程中的重要信号分子。Dillon 等^[10]研究发现:DHEAS 通过 PPAR 的作用增加脂质代谢酶的表达以调节胰岛素分泌,进而通过增加胞内 LC-CoA 促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌。

高胰岛素血症可刺激卵巢雄激素生成增加,抑制肝脏 SHBG 的合成而使游离雄激素水平升高,抑制肝合成 IGFBP-1 并增加 IGF 的生物利用度,影响中枢促性腺激素的分泌。对于青年女性,高 DHEAS 血症可能是众多导致高胰岛素血症的原因之一,高胰岛素血症又使血睾酮水平升高,促使 PCOS 的发生

和发展;当然,这一推测有待进一步的体内外实验加以证实。

综上所述,本研究从细胞学水平证实了 DHEAS 具有促进 MIN6 细胞释放葡萄糖刺激的胰岛素分泌的作用,可能同时涉及基因转录和非基因转录机制。在体内,高 DHEAS 水平可能导致高胰岛素血症,参与 PCOS 的发生和发展。

[参考文献]

- [1] Sozen I, Arici A. Hyperinsulinism and its interaction with hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome[J]. Obstet Gynecol Surv, 2000, 55(5): 321–328.
- [2] Dhatariya K, Bigelow ML, Nair KS. Effect of dehydroepiandrosterone replacement on insulin sensitivity and lipids in hypoadrenal women[J]. Diabetes, 2005, 54(3): 765–769.
- [3] Livadas S, Dracopoulou M, Vasileiadis K, et al. Elevated coagulation and inflammatory markers in adolescents with a history of premature adrenarche[J]. Metabolism, 2009, 58(4): 576–581.
- [4] Koursta E. Premature adrenarche leads to polycystic ovary syndrome? Long-term consequences[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1092: 148–157.
- [5] Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, et al. Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(8): 2854–2864.
- [6] Sugiyama H, Yamada J, Takama H, et al. Photoaffinity labeling of peroxisome proliferator binding proteins in rat hepatocytes; dehydroepiandrosterone sulfate-and bezafibrate-binding proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1339(2): 321–330.
- [7] Waxman DJ. Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator[J]. J Endocrinol, 1996, 150(Suppl.): S129–S147.
- [8] Yamada J, Sugiyama H, Watanabe T, et al. Transcriptional induction of Acyl-CoA oxidase by dehydroepiandrosterone sulfate in cultured rat hepatocytes[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(4): 630–631.
- [9] Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM[J]? Diabetes, 1996, 45(3): 273–283.
- [10] Dillon JS, Yaney GC, Zhou Y, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and beta-cell function: enhanced glucose-induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic beta-cells[J]. Diabetes, 2000, 49(12): 2012–2020.

[收稿日期] 2010-10-03

[本文编辑] 王淑平