

糖尿病小鼠胰腺组织 Netrin-1 表达及意义

李 琪,谷庆炜,曹 欣,李 倩*

南京医科大学附属南京医院内分泌科,江苏 南京 210006

[摘要] 目的:研究糖尿病小鼠胰腺组织中 Netrin-1 的表达并探讨其在糖尿病发生过程中的作用。方法:C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组和糖尿病模型组,应用 RT-PCR 和 Western blot 方法分别检测小鼠胰腺组织中 Netrin-1 mRNA 和蛋白的变化;在正常和异常葡萄糖浓度下培养大鼠胰岛细胞瘤细胞(ins-1),MTT 检测细胞活性,RT-PCR 和 Western blot 方法分别测定 Netrin-1 mRNA 和蛋白的表达情况。结果:糖尿病小鼠胰腺组织内 Netrin-1 的 mRNA 和蛋白表达增加,高浓度葡萄糖刺激 ins-1 细胞上调 Netrin-1 mRNA 和蛋白的表达。结论:糖尿病小鼠胰腺组织表达 Netrin-1 的水平增加,这与血糖异常相关,Netrin-1 可能与糖尿病的发生发展相关。

[关键词] 2型糖尿病;胰腺;Netrin-1;血糖;ins-1 细胞

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1039-04

doi:10.7655/NYDXBNS20180805

Expression and significance of Netrin-1 in pancreatic tissue in diabetic mice

Li Qi, Gu Qingwei, Cao Xin, Li Qian*

Department of Endocrinology, Nanjing First Hospital, NMU, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** To study the expression of Netrin-1 in pancreatic tissue in diabetic mice and explore the significance in the development of type 2 diabetes mellitus. **Methods:** C57BL/6J mice were divided into the normal group and the diabetic model group. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of Netrin-1 in pancreatic tissue in mice; Ins-1 cells was cultured in medium with normal and abnormal concentration of glucose. MTT was used to detect the cell viability. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein of Netrin-1 respectively. **Results:** The mRNA and protein expression of Netrin-1 increased in pancreatic tissue of diabetic mice. While high concentration of glucose up-regulated the mRNA and protein expression of Netrin-1 in ins-1 cells. **Conclusion:** The level of Netrin-1 increases in pancreatic tissue in diabetic mice which correlates with the abnormal concentration of glucose. Netrin-1 may participate in the pathophysiology of diabetes.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; pancreatic tissue; Netrin-1; blood glucose; ins-1 cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08):1039-1042, 1053]

糖尿病的发病率在全球范围内呈增加趋势,严重威胁人类健康。2型糖尿病发生发展的重要因素是机体对胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足,引起这两个因素的主要原因包括炎症、氧化应激、细胞凋亡等,但目前还没有明确其发生的具体原因。生

存因子 Netrin-1 在体内多种组织中表达,如胰腺、肾脏、肺等,并广泛参与了炎症、组织损伤、血管生成等多种病理生理过程^[1],在冠心病、肺炎、胰腺炎、肿瘤等疾病中发挥了重要作用^[2]。既然 Netrin-1 能够参与多种组织的炎症过程,同时又在胰腺组织中表达,那么在2型糖尿病的发病过程中,Netrin-1 在胰岛组织上的表达可能发生变化,参与糖尿病的病理过程。本研究的主要目的是观察 Netrin-1 在糖尿病小鼠胰腺组织上表达情况,同时从细胞水平观察糖代谢异常情况下对 Netrin-1 表达的影响,这为探讨

[基金项目] 国家自然科学基金(81200594);江苏省自然科学基金项目(BK20171121);南京市医学科技发展项目(ZKX14037)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shygu@njmu.edu.cn

糖尿病的预防和治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级健康6~8周龄C57BL/6J小鼠[许可证编号为SCXK(苏)2015-001,南京医科大学模式动物研究所]饲养于南京医科大学附属南京医院动物实验中心,标准温度和湿度下保持12 h交替昼夜节律,适应性喂养1周,自由摄食和饮水。

大鼠胰岛细胞瘤细胞株(ins1细胞)由南京医科大学第一附属医院武晓泓教授赠送。培养液为RPMI1640(含双抗,南京凯基生物技术有限公司)加入5%的胎牛血清(Gibco公司,美国),100 μ L β -巯基乙醇。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和造模

12只C57BL/6J小鼠适应性喂养1周后,随机分为2组,即正常对照组($n=6$,应用普通饲养喂养)、糖尿病模型组($n=6$,应用高脂饲料喂养),4周后,禁食12 h后腹腔注射链脲佐菌素(STZ,75 mg/kg)。所有小鼠5周后行腹腔葡萄糖耐量实验,每周测量体重及血糖,4周后再次行腹腔葡萄糖耐量实验。

1.2.2 腹腔葡萄糖耐量实验

小鼠禁食15 h后,腹腔注射葡萄糖2 g/kg,在尾部用采血针分别于注射前(0 min)及注射后30、60、120 min采血约20 μ L,使用强生稳豪血糖仪测定血糖。

1.2.3 细胞分组

正常葡萄糖组:含5 mmol/L葡萄糖RPMI1640培养基培养;高浓度葡萄糖组:25 mmol/L葡萄糖RPMI1640培养基培养。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养24 h。干预前进行MTT实验检测确保两组间细胞活性差异无统计学差异,24 h干预后再次行MTT实验。实验均重复3次。

1.2.4 Western blot检测小鼠胰腺及ins-1细胞中Netrin-1蛋白的表达

细胞及组织蛋白提取以后,与预染蛋白marker一起上样,进行SDS-PAGE电泳,电泳完后将蛋白转到PVDF膜上,将膜用含5%BSA的TBST封闭2 h,然后与经1:1 000稀释后的一抗(Cell Signaling公司,美国)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,用TBST洗膜3次,每次10 min,与经1:1 000稀释后的二抗(Cell Signaling公司,美国)室温孵育1 h,用TBST洗膜3次,每次10 min,用ECL显色试剂盒显示目的条带。用同样的方法检测

β -actin(武汉BOSTER公司)用作对照。

1.2.5 RT-PCR检测小鼠胰腺及ins-1细胞中Netrin-1 mRNA的表达

细胞总RNA使用TRIzol试剂(Sigma-Aldrich公司,美国)从组织和细胞中提取。RNA提取使用TaKaRa RNase Inhibitor Reagent(TaKaRa公司,大连)。逆转录,cDNA合成使用PrimeScriptTM RT Master Mix(TaKaRa公司,大连)。RT-PCR反应条件如下:95 $^{\circ}$ C变性30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,然后60 $^{\circ}$ C 34 s,40个循环。最后延伸5 min。目的基因Netrin-1引物,上游:5'-AAG-CCTATCACCCACCGGAAG-3',下游:5'-GCGCCAC-AGGAATCTTGATGC-3'。内参照 β -肌动蛋白(β -actin)引物,上游:5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3',下游:5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。取PCR产物5 μ L,加入溴酚蓝2 μ L,在1%琼脂糖凝胶电泳,紫外线凝胶成像系统检测,采集图片。测定每个样本Netrin-1与内参照 β -actin的PCR扩增产物的吸光度值,两者的比值作为待测样本mRNA表达水平。

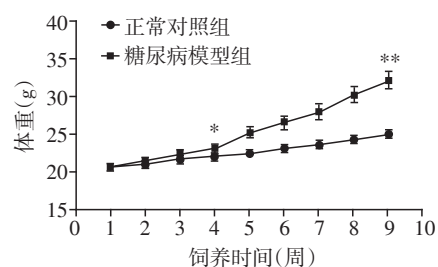
1.3 统计学方法

定量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用GraphPad Prism 5统计软件进行统计分析,2组间比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠在实验期间的体重变化

前4周高脂喂养的糖尿病模型组小鼠与正常对照组小鼠相比体重明显增加($P < 0.01$);注射STZ之后,两组体重差异逐渐增大,差异有统计学意义($P < 0.001$,图1)。



与正常对照组相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$, $n=6$ 。

图1 正常对照组和糖尿病模型组中小鼠体重情况

Figure 1 Weight of mice in the normal group and the diabetic model group

2.2 小鼠第5周及第9周的腹腔注射糖耐量实验情况

小鼠第5周及第9周的空腹血糖轻度增加($P < 0.05$),餐后30、60、120 min血糖均显著增加(图2)。

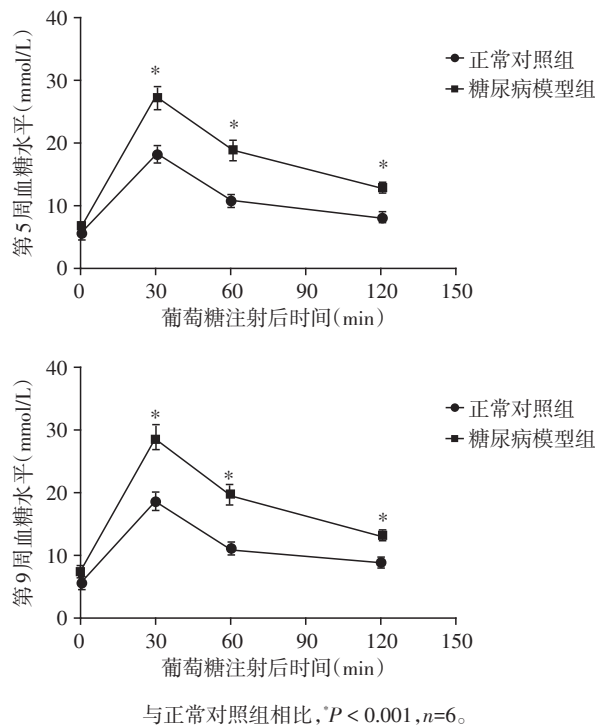


图2 正常对照组和糖尿病模型组中小鼠腹腔葡萄糖耐量
Figure 2 IGTT of mice in the normal group and the diabetic model group

2.3 Western blot 和定量 PCR 检测胰腺中 Netrin-1 蛋白及 mRNA 表达情况

糖尿病模型组小鼠胰腺中 Netrin-1 蛋白的表达较正常对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在糖尿病模型组的小鼠胰腺中 Netrin-1 mRNA 的表达较正常对照组显著增加,差异有统计学意义($P < 0.001$,图3)。

2.4 MTT 检测细胞增殖活性情况

在处理 24 h 后,与正常葡萄糖浓度相比较,高浓度葡萄糖组的细胞增殖活性明显降低($P < 0.01$,图4)。

2.5 Western blot 和定量 PCR 检测的细胞中 Netrin-1 蛋白及 mRNA 表达情况

高浓度葡萄糖组中 Netrin-1 的蛋白($P < 0.01$)和 mRNA($P < 0.001$)表达较正常葡萄糖浓度明显升高(图5)。

3 讨论

Netrin-1 作为一种新的生存因子,在多种组织和器官中表达,在胚胎期参与组织和器官的形成和发育;在成体参与血管新生、细胞迁移和炎症等多种生理病理过程,具有多功能的作用^[3-6],在心脑血管疾病等研究领域受到学者的高度重视^[7-8]。

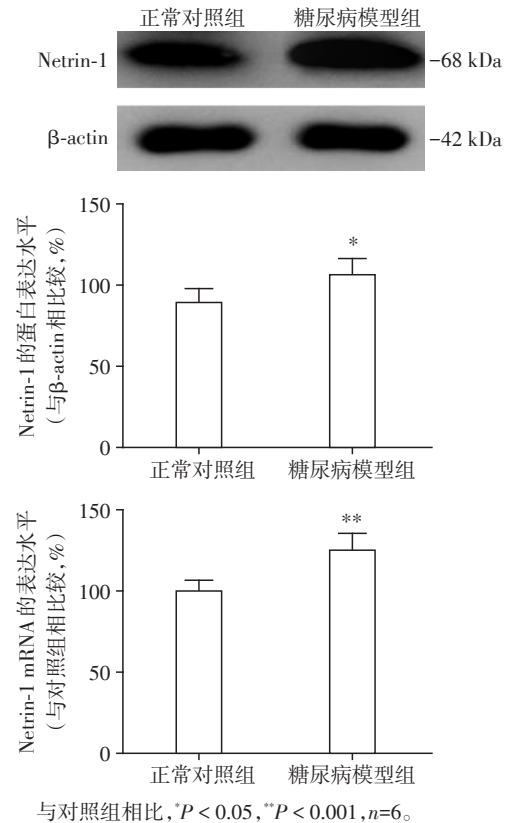


图3 正常对照组及糖尿病模型组中小鼠胰腺中 Netrin-1 蛋白及 mRNA 表达水平

Figure 3 Expression of Netrin-1 protein and mRNA in the pancreas of mice from the normal group and diabetic model group

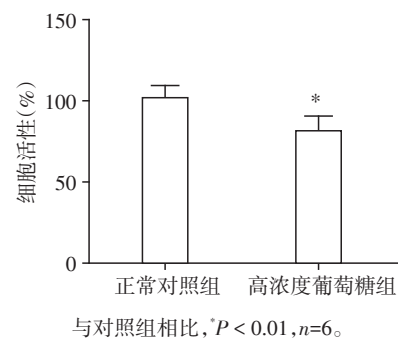


图4 正常对照组和高浓度葡萄糖组中 ins-1 细胞的细胞活性

Figure 4 Activity of ins-1 cells culture with normal concentration of glucose and with high concentration of glucose

本研究提示在糖尿病模型小鼠的胰腺中 Netrin-1 蛋白和 mRNA 的表达较血糖正常的小鼠明显上调。推测其上调原因可能与血糖异常有关,因此,又设计异常葡萄糖浓度下,胰岛细胞中 Netrin-1 表达情况。实验结果表明,与正常葡萄糖浓度下培养

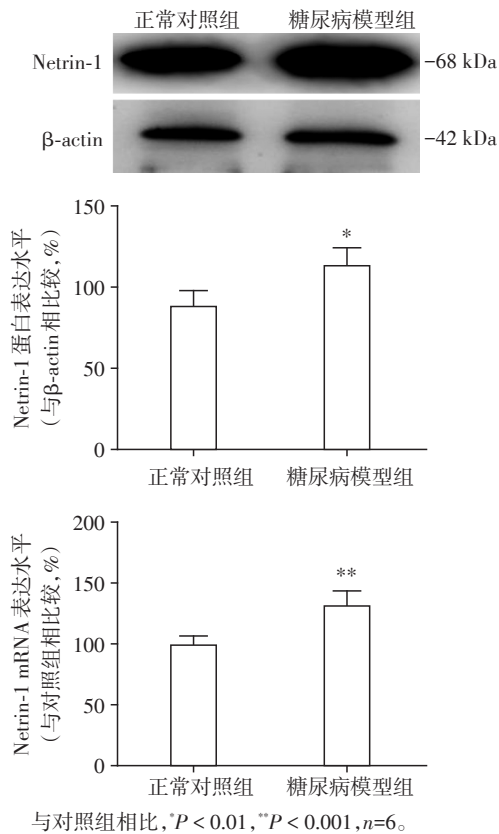


图5 正常对照组和高浓度葡萄糖组中 ins-1 细胞内 Netrin-1 蛋白及 mRNA 表达水平

Figure 5 Expression of Netrin-1 protein and mRNA in ins-1 cells culture with normal concentration of glucose and high concentration of glucose

的 ins-1 细胞相比,高浓度葡萄糖培养的 ins-1 细胞中 Netrin-1 蛋白和 mRNA 的表达明显增加,这说明高浓度葡萄糖可以促进 Netrin-1 的表达。

众所周知,2型糖尿病是一种慢性低度炎症代谢性疾病,其中部分机制是肥胖引起机体慢性炎症反应,导致胰岛素抵抗、血糖异常乃至糖尿病的发生^[9]。Netrin-1 在机体的慢性炎症过程中也起着一定的作用。Gurses 等^[10]研究提示 Netrin-1 通过其受体 Unc5b 诱导机体炎症因子表达,与巨噬细胞浸润和活化相关,在动脉粥样硬化过程中起着一定保护作用。同样有研究表明慢性缺氧以及缺氧引起的炎症可以诱导 Netrin-1 的表达^[11],HIF-1 α 是一种由缺氧诱导表达的因子,研究表明这种因子可以促进细胞内 Netrin-1 的表达^[12]。最新研究证实肥胖人体及大鼠体内的白色脂肪中 Netrin-1 的水平升高,该研究认为白色脂肪内慢性低度炎症可以通过炎症因子 IL-6、TNF- α 等调节 Netrin-1 的浓度^[13]。这些研究均提示 Netrin-1 在炎症的发生发展过程中起着一定作用。本研究提示,糖尿病模型小鼠的体重和血

糖逐渐增高,到研究结束时明显高于正常对照组,同时伴有 Netrin-1 表达异常,这说明 Netrin-1 在糖尿病的发生发展过程中也起着一定作用,但具体机制还需深入研究。

本研究小组曾检测过新诊断2型糖尿病患者体内 Netrin-1 的水平,结果提示,与健康对照组相比,新诊断2型糖尿病患者体内 Netrin-1 水平明显降低^[14],因此推测,2型糖尿病在血糖异常时,胰腺组织中 Netrin-1 表达增加,集中在胰腺组织周围,参与胰腺组织的炎症反应,保护胰岛细胞功能,进入外周血循环中 Netrin-1 减少,这可能是机体对糖尿病前期的一种保护性反应,抑制疾病的发生发展,其中具体机制尚需要进一步研究。

综上所述,糖尿病小鼠胰腺组织上 Netrin-1 表达增加,这与血糖异常相关,其在胰腺组织的生存过程中可能起着一定作用,与糖尿病的发生发展相关,但具体机制尚需进一步研究,这为糖尿病的预防和治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Wilson BD, Li M, Park KW, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis[J]. *Science*, 2006, 313(5787):640-644
- [2] Oksala N, Parssinen J, Seppala I, et al. Association of neuroimmune guidance cue netrin-1 and its chemorepulsive receptor UNC5B with atherosclerotic plaque expression signatures and stability in human(s): Tampere Vascular Study (TVS) [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013, 6(6): 579-587
- [3] Tu T, Zhang C, Yan H, et al. CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development[J]. *Cell Res*, 2015, 25(3):275-287
- [4] Lv J, Sun X, Ma J, et al. Netrin-1 induces the migration of Schwann cells via p38 MAPK and PI3K-Akt signaling pathway mediated by the UNC5B receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(1):263-268
- [5] Mediero A, Wilder T, Ramkhalawon B, et al. Netrin-1 and its receptor Unc5b are novel targets for the treatment of inflammatory arthritis [J]. *FASEB J*, 2016, 30(11): 3835-3844
- [6] Nishitani AM, Ohta S, Yung AR, et al. Distinct functions for netrin 1 in chicken and murine semicircular canal morphogenesis [J]. *Development*, 2017, 144(18): 3349-3360
- [7] Munoz JC, Martin R, Alonso C, et al. Relation between serum levels of chemotaxis-related factors and the presence

(下转第 1053 页)

的小鼠肝脏损伤中,FGF21可以通过促进过氧化物酶体增殖物激活受体共激活剂蛋白1 α (PGC-1 α)的表达激活Nrf2,导致下游抗氧化相关基因的表达,提高细胞抗氧化能力^[10-11]。这一机制在小鼠缺血再灌注损伤模型中或许同样适用。

目前尚未见到关于FGF21在肝脏缺血再灌注中作用研究的报道,本研究发现FGF21对小鼠肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抑制肝缺血再灌注后的氧化应激反应有关,提示FGF21有可能在肝脏外科领域中有其应用价值。当然这仍需要大量的基础及临床试验验证,其具体机制也需要进一步研究探索,但本研究为临床上应对肝脏手术后的缺血再灌注损伤提供了一个新线索。

[参考文献]

- [1] Miyashita T, Nakanuma S, Ahmed AK, et al. Ischemia reperfusion-facilitated sinusoidal endothelial cell injury in liver transplantation and the resulting impact of extravasated platelet aggregation[J]. *Eur Surg*, 2016, 48(1):92-98
- [2] Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: update on molecular and future perspectives [J]. *Hepatol Res*, 2016, 47(1):31-48
- [3] Li J, Li RJ, Lv GY, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(11):2036-2047
- [4] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21[J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78(3):223-241
- [5] Ye D, Wang Y, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1 α -mediated antioxidant capacity in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 60(7):977-989
- [6] Ye D, Li H, Wang Y, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker for severe ischemia/reperfusion injury in patients with liver transplantation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19776
- [7] Asakawa H, Jeppsson B, Mack P, et al. Acute ischemic liver failure in the rat: A reproducible model not requiring portal decompression [J]. *Eur Surg Res*, 1989, 21(1):42-48
- [8] Kevin A. Morano, Chris M. Grant, et al. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2012, 190(4):1157-1195
- [9] 骆助林,汤礼军,汪涛,等.氢气生理盐水对大鼠肝缺血再灌注后氧化应激损伤的保护作用[J]. *创伤外科杂志*, 2013, 15(2):157-159
- [10] Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Nuclear recruitment of neuronal nitric-oxide synthase by α -synuclein is crucial for the induction of mitochondrial biogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1):365-378
- [11] Aquilano K, Baldelli S, Barbera LL, et al. Adipose triglyceride lipase decrement affects skeletal muscle homeostasis during aging through FAs-PPAR α -PGC-1 α antioxidant response [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17):23019-23032

[收稿日期] 2017-12-23

(上接第1042页)

- of coronary artery calcification as expression of subclinical atherosclerosis [J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(18):1048-1055
- [8] Xing Y, Lai J, Liu X, et al. Netrin-1 restores cell injury and impaired angiogenesis in vascular endothelial cells upon high glucose by PI3K/AKT-eNOS [J]. *J Mol Endocrinol*, 2017, 58(4):167-177
 - [9] Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility [J]. *Cell*, 2015, 160(5):816-827
 - [10] Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D, et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease [J]. *J Cardiol*, 2017, 69(6):851-858
 - [11] Ramkhalawon B, Yang Y, van Gils JM, et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6):1180-1188
 - [12] Wang J, Zhou X, Lu H, et al. Fluoxetine induces VEGF/Netrin overexpression via the mediation of Hypoxia-inducible factor 1- α in SH-SY5Y cells [J]. *J Neurochem*, 2015. DOI:10.1111/jnc.13521. [Epub ahead of print]
 - [13] Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Menager M, et al. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4):377-384
 - [14] Liu C, Ke X, Wang Y, et al. The level of netrin-1 is decreased in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients [J]. *BMC Endocr Disord*, 2016, 16(1):33

[收稿日期] 2018-02-21