

# 艾塞那肽对高糖诱导 INS-1 细胞内质网应激及 JNK 信号通路的影响

张 强 陈 轩 徐 亮

**摘 要** **目的** 探讨艾塞那肽对高糖诱导 INS-1 细胞的内质网应激(ERS)及对 JNK 信号通路的影响。**方法** 小鼠 INS-1 细胞按不同的处理方式分为 4 组:对照组(A 组,完全培养基)、高糖组(B 组,30mmol/L 糖培养基)、高糖 + 100nmol/L 艾塞那肽组(C 组)、高糖 + 100nmol/L 艾塞那肽 + JNK 激动剂组(D 组)。每天换液前观察各组细胞生存状态,培养 7 天后,MTT 法检测细胞活性;提取细胞总蛋白,Western blot 法检测 Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3 蛋白的表达水平。**结果** 培养至第 4 天 B 组细胞出现死亡,培养至第 6、7 天 B 组及 D 组细胞出现大量死亡;与 A 组比较,B 组和 D 组的活性(A 值)下降( $P < 0.05$ );与 A 组比较,B 组高糖刺激后导致内质网应激上调 Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3 的表达量( $P < 0.05$ );与 B 组比较,C 组艾塞那肽可通过抑制内质网应激下调 Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3 表达量( $P < 0.05$ );与 C 组比较,D 组 JNK 激动剂促进 JNK 信号通路上调 P-SAPK/JNK、caspase-3 表达量( $P < 0.05$ )。**结论** 艾塞那肽可以缓解或阻断高糖刺激诱发的 INS-1 细胞内质网应激(ERS),抑制 JNK 信号通路,减少细胞凋亡。

**关键词** 艾塞那肽 高糖 INS-1 细胞 内质网应激 JNK 信号通路

**中图分类号** R656.6

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.022

**Effects of Exendin-4 on Endoplasmic Reticulum Stress Induced by High Glucose and JNK Signaling Pathway in INS-1 Cells.** Zhang Qiang, Chen Xuan, Xu Liang. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan, 646000, China

**Abstract** **Objective** To explore the effects of exendin-4 on endoplasmic reticulum stress induced by high glucose and JNK signaling pathway in INS-1 cells. **Methods** Mouse INS-1 cells were divided into 4 groups according to different treatment methods, the control group (group A, complete medium), high glucose group (group B, 30mmol/L glucose medium), high glucose + 100nmol/L exendin-4 group (group C), high glucose + 100nmol/L exenatide-4 + JNK agonist (group D). We observed the survival status of each group in every day. After cultured for 7 days, cell survival was assessed by MTT staining. Total cellular protein was extracted. We used Western blot to detect the expression of Bip, CHOP, P-SAPK/JNK and caspase-3. **Results** After the fourth day of culture, the cells in group B start died, and a large number of cell deaths occurred in groups B and D until the sixth and seventh days. Compared with group A, the cell activity of group B and group D decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with group A, the group B up-regulated the expression of Bip, CHOP, P-SAPK/JNK and caspase-3 ( $P < 0.05$ ). Compared with group B, group C down-regulated the expression of Bip, CHOP, P-SAPK/JNK and caspase-3 ( $P < 0.05$ ). Compared with group C, group D promoted JNK signaling upregulate the expression of P-SAPK/JNK and caspase-3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Exendin-4 can ameliorate or block INS-1 cell endoplasmic reticulum stress (ERS) induced by high glucose, inhibit JNK signaling pathway and reduce cell apoptosis.

**Key words** Exendin-4; High glucose; INS-1 cells; Endoplasmic reticulum stress (ERS); JNK signaling

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种常见的、多发的内分泌代谢性疾病,其发病环节主要是胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛  $\beta$  细胞功能受损。现相关研究发现内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS)、炎症反应是导致糖尿病、IR 和肥胖发生

的重要途径。胰高血糖样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是肠-胰岛轴中控制 T2DM 最核心的介导因子,可抑制  $\beta$  细胞凋亡并促进  $\beta$  细胞在体外和体外培养的细胞增殖<sup>[1]</sup>。艾塞那肽是第一个获得 FDA 批准用于临床的短效 GLP-1 类似物类降糖药<sup>[2]</sup>。

基金项目:四川省卫生行业科研专项基金资助项目(201302016)

作者单位:646000 泸州,西南医科大学附属医院胃肠外科

通讯作者:徐亮,主任医师,电子信箱:493491191@qq.com

## 材料与方法

1. 研究材料:小鼠 INS-1 细胞购自上海华拓生

物有限公司;培养基(DMEM, 1640)、平衡盐溶液(PBS)、澳洲胎牛血清(FBS)及胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)或应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)抗体、免疫球蛋白结合蛋白(BiP)、CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、凋亡蛋白(caspase-3)、内参( $\beta$ -actin)购自美国Cell Signaling Technology(CST)公司;RIPA裂解液、PMSF酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、BSA封闭液、山羊抗鼠、山羊抗兔、MTT试剂盒、PVDF膜发光试剂盒(BeyoECL Plus)购于碧云天生物技术公司;JNK激动剂(Anisomycin)购于Selleck公司;艾塞那肽(Exendin-4)购于美国MCE公司。

2. 细胞分组及培养:根据细胞生长情况,将对数期生长的INS-1细胞按不同的处理方式分为4组:对照组(A组,完全培养基)、高糖组(B组, 30mmol/L高糖培养基);高糖+100nmol/L艾塞那肽组(C组);高糖+100nmol/L艾塞那肽+250ng/ml JNK激动剂(Anisomycin)组(D组);完全培养基(含10%胎牛血清及1%双抗的1640培养基),于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养,每隔24h换液1次,高糖组采用间断性高糖刺激(即30mmol/L高糖培养基与正常糖浓度培养基24h交替培养),C组培养(高糖+100nmol/L艾塞那肽与正常培养基+100nmol/L艾塞那肽24h交替培养),D组前5天培养为(高糖+100nmol/L艾塞那肽与正常培养基+100nmol/L艾塞那肽24h交替培养),最后2天加入250ng/ml JNK激动剂处理。培养7天后提取总蛋白,提取蛋白保存于-80℃冰箱备

用。每天换液前,于500倍相差显微镜下观察各组细胞的生长情况。MTT法检测细胞的活性,用酶标仪检测其在490nm波长下的吸光度值(A值)。

3. Western blot法检测Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3蛋白的表达量:用预冷的PBS液洗细胞3次,吸尽PBS后,加入含1%PMSF酶抑制剂及1%磷酸酶抑制剂的细胞裂解液(RIPA)约400 $\mu$ l提取各组细胞总蛋白,离心(20000r/min 15min)去除沉淀,BCA测定蛋白浓度,加5 $\times$ 上样缓冲液煮沸(100℃ 5min),取相同质量的蛋白上样,硫代硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳;转移至硝酸纤维素膜(PVDF),5%的BSA常温下封闭1h, TBST洗膜3次(每次5min),一抗(1:1000)4℃摇床孵育过夜, TBST洗膜3次,二抗(1:1000)室温孵育1h, TBST洗膜3次后,曝光显影。利用图像分析软件Fusion对条带进行灰度值定量分析,用“目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值之比”代表靶蛋白的相对表达量。

4. 统计学方法:采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计分析,每项实验均重复3次及以上,所有数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 显微镜下观察各组细胞的生长情况:与对照组比较,高糖组培养至第4天细胞开始出现死亡,第6、7天死亡细胞较多;JNK激动剂组在激动剂刺激后出现大量细胞死亡,高糖+艾塞那肽组与对照组比较细胞存活状态无明显变化,详见图1。

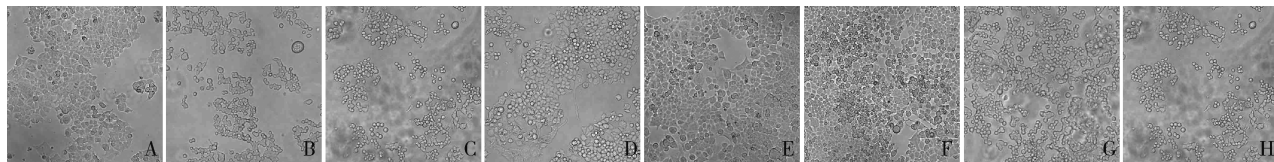


图1 各组细胞的生长情况( $\times 500$ )

A. 对照组第2天;B. 高糖组第2天;C. 高糖+100nmol/L艾塞那肽组第2天;D. 高糖+艾塞那肽+JNK激动剂组第2天;  
E. 对照组第7天;F. 高糖组第7天;G. 高糖+100nmol/L艾塞那肽组第7天;H. 高糖+艾塞那肽+JNK激动剂组第7天

2. MTT检测各组细胞的活性:高糖组、JNK激动剂组细胞的吸光度与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );高糖+艾塞那肽组细胞的吸光度与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图2。

3. 各组细胞经过不同处理7天后Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3蛋白的表达量。间歇性高

糖刺激组上调Bip、CHOP、P-SAPK/JNK、caspase-3表达量,与对照组比较,分别增加1.70、1.21、1.12、1.15倍( $P < 0.05$ );高糖+艾塞那肽组与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );高糖+艾塞那肽+激动剂组,上调P-SAPK/JNK、caspase-3表达量,与对照组比较,分别增加1.14、1.22倍( $P <$

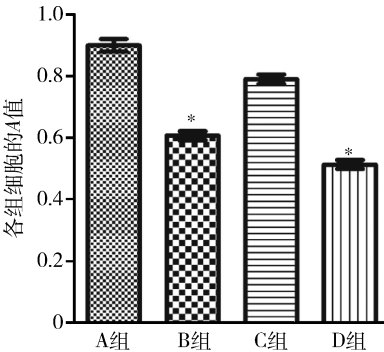


图2 各组细胞的A值  
与A组比较,\**P* < 0.05

0.05), Bip、CHOP 与对照组比较,差异无统计学意义 (*P* > 0.05),详见图3。

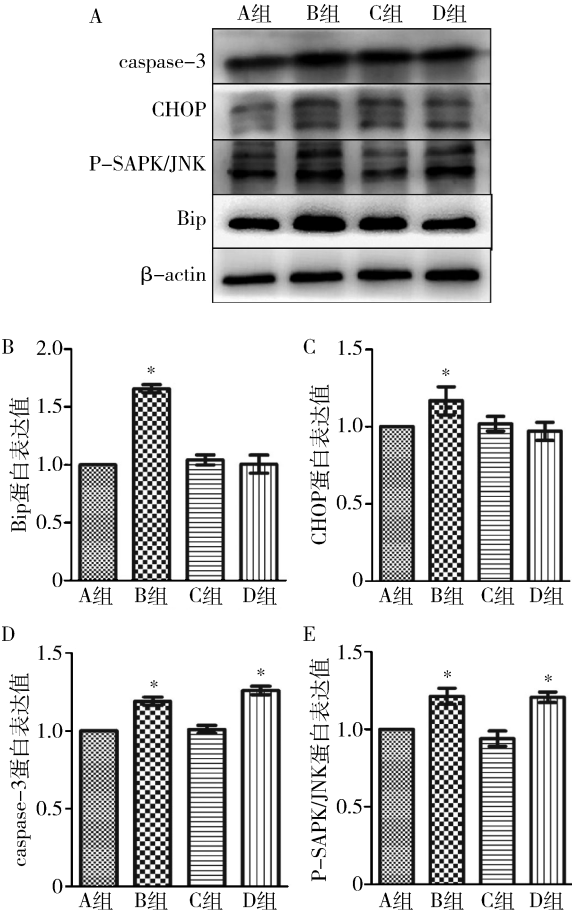


图3 培养7天后各组蛋白质的表达量

A. 各组细胞不同蛋白表达量;B. Bip 蛋白表达量;C. CHOP蛋白表达量;D. caspase-3 蛋白表达量;E. P-SAPK/JNK 蛋白表达量;  
与A组比较,\**P* < 0.05

讨 论

早期研究已经证实 T2DM 的发病环节主要是胰岛素抵抗 (IR) 和胰岛 β 细胞功能受损,但确切机制

尚未阐明。近年来有研究认为炎症反应在 IR、T2DM 和肥胖的发病中起重要作用。2004 年 Ozcan 等<sup>[3]</sup> 则提出内质网应激 (ERS) 是导致糖尿病、IR 和肥胖发生的重要途径。在肥胖小鼠模型中,检测肝脏、脂肪和肌肉组织中内质网应激的标志分子,如双链 RNA 依赖蛋白激酶样内质网激酶 (PERK)、翻译起始因子 2α (eIF2α) 和 c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 的磷酸化水平以及葡萄糖调节蛋白 (BiP) mRNA 表达水平。结果显示,肝脏和脂肪组织中上述 4 种分子的磷酸化和 mRNA 水平均显著增强。在内质网应激时,肌醇需求激酶-1α (IRE-1α) 磷酸化增强,导致肿瘤坏死因子 (TNF) 受体相关因子 2 的募集而激活 JNK。由此提示,内质网应激通过 IRE-1α 和 JNK 依赖的蛋白激酶级联通路促进胰岛素受体底物 (IRS-1) 的丝氨酸磷酸化,进而影响胰岛素的信号转导,导致 IR。

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 由末端回肠和结肠神经内分泌 L 细胞产生。其生物活性主要包括促进胰岛素的分泌、改善胰岛素对血糖的敏感度、抑制胰高血糖素的分泌、保护胰岛细胞,减少胰岛细胞的凋亡、抑制胃排空和胃酸的分泌等<sup>[4-6]</sup>。有研究表明,2 型糖尿病患者血液中的 GLP-1 量及效应明显低于正常患者<sup>[7]</sup>。在体外试验中,Exendin-4 通过抑制 IRE1-JNK-caspase-3 信号通路减少叔丁基过氧化氢 (t-BHP) 诱导的 β 细胞凋亡,GLP-1 还通过抑制 NF-κB 信号通路抑制 IL-1β 诱导的 INS-1 细胞损伤<sup>[8,9]</sup>。

本研究结果显示,参与内质网应激的特异性相关信号分子 CHOP 和 BiP 蛋白在高糖刺激组有高表达,而高糖 + 艾塞那肽组 CHOP 和 BiP 蛋白相对于对照组,差异无统计学意义,揭示了高糖可诱导内质网应激,而艾塞那肽可抑制内质网应激。高糖 + 艾塞那肽 + JNK 激动剂组通过艾塞那肽抑制内质网应激,相比于 B 组下调 CHOP 及 BiP 的表达量下调,同时 JNK 激动剂激活 JNK 信号通路上调 P-SAPK/JNK 及特异性凋亡信号分子 caspase-3 表达量,同时相对于对照组,高糖刺激组 P-SAPK/JNK 表达上调,揭示了通过高糖的刺激可能与 JNK 信号通路有关。多项研究表明,β 细胞是对内质网应激最为敏感的组织之一,内质网应激介导的 β 细胞凋亡是糖尿病发病的重要机制<sup>[10]</sup>。Wang 等<sup>[11-14]</sup> 研究发现长期高糖处理可引起大鼠胰岛素瘤细胞系 INS-1 细胞中内质网应激特征性标志分子如 CHOP 和 BiP 表达增加,推测长期高糖通过引起蛋白质合成的过度负荷导致内质网应激。

综上所述,GLP-1 类似物艾塞那肽可通过抑制

高糖诱导的 INS - 1 细胞的内质网应激,进而抑制 JNK 信号通路,保护胰岛细胞,减少细胞凋亡,从而达到治疗 T2DM 的效果。

### 参考文献

- Ji Q. Treatment strategy for type 2 diabetes with obesity: focus on glucagon - like peptide - 1 receptor agonists[J]. Clin Therapeut, 2017, 39(6):1244 - 1264
- Wang A, Li T, An P, *et al.* Exendin - 4 upregulates adiponectin level in adipocytes via sirt1/Foxo - 1 signaling pathway[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169469
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes [J]. Science, 2004, 306:457 - 461
- Pournaras DJ, Osborne A, Hawkins SC, *et al.* Remission of type 2 diabetes after gastric bypass and banding: mechanisms and 2 year outcomes. [J]. Ann Surg, 2010, 252(6):966 - 971
- Allen RE, Hughes TD, Jia LN, *et al.* Mechanisms behind the immediate effects of Roux - en - Y gastric bypass surgery on type 2 diabetes [J]. Theoret Biol Med Model, 2013, 10(1):1 - 19
- Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen - Møller KN, *et al.* Mechanisms of improved glycaemic control after Roux - en - Y gastric bypass [J]. Diabetologia, 2012, 55(7):1890 - 1901
- Williams DL. Minireview: finding the sweet spot: peripheral versus central glucagon - like peptide 1 action in feeding and glucose homeostasis[J]. Endocrinology, 2009, 150(7):2997 - 3001
- Chunli P, Jin M, Zhao Z, *et al.* Study on effect of jiedu tongluo tiaogan prescription on IRE1 $\alpha$ /JNK pathway in pancreatic tissue of type 2 diabetes[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018
- 李圣坚, 薛耀明, 李佳, 等. GLP - 1 通过抑制 NF -  $\kappa$ B 信号通路减少 IL - 1 $\beta$  对 INS - 1 细胞的损伤作用 [C]. 2010 中国医师协会内分泌代谢科医师分会年会论文汇编, 2010
- Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta - cells and diabetes mellitus[J]. Exp Biol Med, 2003, 228:1213 - 1217
- Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP - 1 activation are implicated in beta - cell glucolipotoxicity [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 17):3905
- Wang Y, Gu YH, Liu M, *et al.* TBHQ alleviated endoplasmic reticulum stress - apoptosis and oxidative stress by PERK - Nrf2 crosstalk in methamphetamine - induced chronic pulmonary toxicity [J]. Oxidat Med Cell Longev, 2017, 2017(11):4310475
- Na C, Dai L, Jiang Y, *et al.* Endoplasmic reticulum stress intolerance in EIF2B3, mutant oligodendrocytes is modulated by depressed autophagy [J]. Brain Dev, 2016, 38(5):507 - 515
- Gao J, Zhang Y, Wang L, *et al.* Endoplasmic reticulum protein 29 is involved in endoplasmic reticulum stress in islet beta cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 1:398 - 402

(收稿日期:2018 - 04 - 18)

(修回日期:2018 - 06 - 11)

## 腹腔镜直肠癌保肛手术术后吻合口漏与钉仓数量关系的研究

何建军 王 新 王银春 杨庆强

**摘 要 目的** 本研究旨在探讨腹腔镜直肠癌保肛手术中钉仓使用数量与术后吻合口漏之间的关系,以期尽量降低吻合口漏的发生。**方法** 回顾性分析 2013 年 1 月 1 日 ~ 2017 年 1 月 1 日 4 年间西南医科大学附属医院胃肠外科行腹腔镜直肠癌保肛手术的 205 例患者的临床资料,总结患者性别、年龄、体重指数 (BMI)、肿瘤下缘距齿状线距离、肿瘤直径、术中出血量、手术时间、术后肛门排气时间等一般情况,分析患者钉仓使用数量与术后吻合口漏之间的关系。**结果** 术中使用 1 枚钉仓的患者为 42 例,术后有 1 例发生吻合口漏;术中使用 2 枚钉仓的患者为 140 例,术后有 8 例发生吻合口漏;术中使用 3 枚钉仓的患者为 23 例,术后有 6 例发生吻合口漏 ( $\chi^2 = 10.087, P = 0.004$ ),差异有统计学意义。**结论** 在腹腔镜直肠癌保肛手术中,钉仓使用数量越多,切缘的交界也就越多,切缘与直肠纵轴之间的角度越大,残余直肠的血供就越差,术后发生吻合口漏的风险越大。

**关键词** 钉仓 腹腔镜 直肠癌 保肛手术 吻合口漏

**中图分类号** R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.023

**Study on the Relationship between Anastomotic Leakage and the Number of Staple Cartridge after Laparoscopic Rectal Cancer Anus - pre-**

基金项目:四川省教育厅自然科学类重点项目 (15ZA0166)

作者单位:646000 泸州,西南医科大学附属医院胃肠外科

通讯作者:杨庆强,电子信箱:yangqingqiang121@163.com