

Toll 样受体 3 对胰岛 β 细胞增殖及胰岛素分泌的影响*

钟大鹏¹, 呈煜², 胡朝恩¹, 刘阳², 邹强², 艾智华^{3△} (1. 泸州医学院, 四川泸州 646000; 2. 成都医学院免疫实验室, 成都 610083; 3. 成都军区总医院, 成都 610083)

【摘要】 目的 通过 Toll 样受体 3(TLR3)激动剂 Poly(I : C)(PIC)刺激小鼠胰岛 β 细胞, 观察 TLR3 对细胞增殖, 炎症因子表达及胰岛素分泌的影响。方法 用小鼠胰岛 β 细胞株 NIT-1 为研究对象, 首先测定胰岛素释放以鉴定胰岛 β 细胞生物活性, 再分别用不同浓度 PIC(0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 NIT-1 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖; 酶联免疫法(ELISA)检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达; 葡萄糖刺激下的胰岛素释放试验(GSIS)测定 NIT-1 细胞分泌胰岛素功能。结果 NIT-1 细胞株呈贴壁、成簇及多边形生长; 胰岛 β 细胞生物活性较好。与对照组相比, 用不同浓度 PIC(0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激时, NIT-1 细胞增殖明显受到抑制, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。PIC 刺激组炎症因子(IL-1 β , IL-6 及 TNF- α)表达明显高于对照组($P < 0.05$)。PIC 刺激可明显抑制高糖诱导下的 NIT-1 细胞分泌胰岛素($P < 0.05$)。结论 PIC 激活胰岛 β 细胞 TLR3, 通过释放 IL-1 β , IL-6 及 TNF- α , 抑制胰岛 β 细胞生长及胰岛素分泌。

【关键词】 Toll 样受体 3; Poly(I : C); NIT-1 细胞株; 胰岛 β 细胞功能

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2810-03

Effects of Toll-like receptor 3 on viability insulin secretion of NIT-1 cells* ZHONG Da-peng¹, CHENG Yu², HU Chao-en¹, LIU Yang², ZOU Qiang², AI Zhi-hua^{3△} (1. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Laboratory of Immunology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 3. General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610083, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of Toll-like receptor 3(TLR3) agonist Poly real(I : C)(PIC) on pancreatic β -cell of mice, observe the effects for cell proliferation, inflammatory cytokine secretion and insulin secretion of NIT-1 cells. **Methods** With mice pancreatic β -cell line NIT-1 for the study, first using insulin release test to identify pancreatic β -cell function, and after treatment with different mass concentrations of PIC(0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the viability of NIT-1 cells was detected by cell counting Kit-8(CCK8) method, the cytokines(IL-1 β , IL-6 and TNF- α) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the insulin secretion of NIT-1 cells was determined by glucose stimulated insulin secretion(GSIS). **Results** NIT-1 cells grow up as anchorage-dependent, clusters and polygon cells, pancreatic β -cells had good biological activity. Compared with the control group, the viability of NIT-1 cells were inhibited in a dose-dependent manner after treating with 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PIC($P < 0.05$), and the inflammatory cytokine secretion was significantly increased after treating with 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PIC($P < 0.05$), the insulin secretion of NIT-1 cells were significantly decreased after treating with 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PIC($P < 0.05$).

Conclusion The viability and insulin secretion of NIT-1 cells is inhibited by inflammatory cytokines secretion after treating with PIC of certain concentrations.

【Key words】 Toll-like receptor 3; Poly(I : C); NIT-1 cell; pancreatic β -cell function

Toll 样受体(TLRs)是一种模式识别受体, 广泛分布于多形核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞中。TLRs 可识别病原相关模式分子(PAMP), 激活体内天然免疫系统及获得性免疫系统, 诱导多种炎症因子释放, 最终导致自身免疫性疾病的发生。近年来, 有研究发现在 1、2 型糖尿病患者体内均有 TLRs 活性升高^[1], 推测 TLRs 在 1、2 型糖尿病患者 β 细胞衰竭中发挥着重要作用。目前, 已在哺乳动物体内发现至少 13 种 TLRs^[2], 其中 TLR3 在机体抗病毒免疫中起重要作用, 它可识别病毒来源的 dsRNA 及其类似物——激动剂 Poly(I : C)诱导抗病毒效应^[3], 但同时也可对自身机体功能造成免疫损伤。有研究显示 TLR3 的激活能明显抑制内皮细胞增殖^[4], 然而 TLR3 的激活对胰岛 β 细胞增殖及生物学功能的影响尚不明确。本研究以小鼠胰岛 β 细胞株为研究对象, 用不同浓度的 PIC 激活胰岛 β 细胞 TLR3, 观察其对胰岛 β 细胞增殖及胰岛素分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株 小鼠胰岛 β 细胞株购自上海斯信生物科技有限公司(ATCC 细胞系)。

1.2 试剂 细胞培养试剂购自 Gibco 公司; Poly(I : C) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附剂测定试剂盒购自 EBIO-SCIENCE 公司。CCK-8 试剂盒购自日本岛津公司; 胰岛素放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 其他常用试剂均为国产分析纯产品。克一林重碳酸盐(KRBH)缓冲培养液配置: NaCl 135 mmol/L, KCl 3.6 mmol/L, NaHCO₃ 5 mmol/L, NaH₂PO₄ 40.5 mmol/L, MgCl 20.5 mmol/L, CaCl 21.5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, BSA 0.1% mmol/L, pH 7.4^[5]。

* 基金项目: 四川省应用基础研究基金项目(2012JY0030)。

作者简介: 钟大鹏, 男, 硕士, 医师, 主要从事糖尿病免疫研究。

△ 通讯作者, E-mail: azh871@sina.com。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 NIT-1 细胞株培养于含 10% 胎牛血清, 50 μmol/L β-巯基乙醇, 100 IU/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 隔天换液, 2~3 d 传代。

1.3.2 胰岛 β 细胞的生物学活性鉴定 胰岛素释放试验: 取密度约 80% 的 NIT-1 细胞, 按每孔 7 000 个的细胞密度接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养。24 h 细胞贴壁后, 细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 加入 KRBH 缓冲培养液 500 μL, 于 37 °C 预孵育 30 min 后弃上清。加入含 3.3 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 缓冲培养液孵育 60 min, 吸取上清液 -80 °C 保存待测; 再次加入含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 缓冲培养液孵育 60 min, 吸取上清液 -80 °C 保存待测。胰岛素测定采用放射免疫法, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 取密度约 80% 的 NIT-1 细胞, 按每孔 7 000 个的细胞密度接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后进行干预。设立空白对照组 (未加 PIC) 和不同 PIC 浓度 (0.1、1、10 μg/mL) 处理组 (每组设 3 个复孔) 继续孵育 24 h 后进行检测。检测方法: 按 100 μL 培养基加入 CCK-8 试剂 10 μL, 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 3 h 后, 用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度 (OD450)。

1.3.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测细胞上清液 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达 取密度约 80% 的 NIT-1 细胞, 按每孔 7 000 个的细胞密度接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后进行干预。设立空白对照组 (未加 PIC) 和 PIC (浓度 1 μg/mL) 处理组 (每组设 3 个复孔) 分别孵育 24 h 后收集细胞上清液 100 μL 待测。ELISA 法检测细胞上清液中的 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达, 具体操作均严格按照试剂盒说明进行。先在酶标仪上测量标准品吸光度并绘制标准曲线, 然后测量样品吸光度 (检测波长均为 492 nm), 并根据测得的吸光度 (A) 值在标准曲线计算出标本的浓度。

1.3.5 葡萄糖刺激下的胰岛素释放 (GSIS) 试验 取培养至 80% 融合的 NIT-1 细胞, 将细胞按每孔 7 000 个的细胞密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后进行干预。设立空白对照组 (未加 PIC) 和不同 PIC 浓度 (0.1、1、10 μg/mL) 处理组, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 检测葡萄糖刺激的胰岛素释放。相应时间取出细胞, 用 PBS 清洗 3 次后, 加入 KRBH 缓冲培养液 500 μL, 于 37 °C 预孵育 30 min 后弃上清液。加入含 3.3 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 缓冲培养液孵育 60 min, 吸取上清液 -80 °C 保存待测; 再次加入含 16.7 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 缓冲培养液孵育 60 min, 吸取上清液 -80 °C 保存待测。胰岛素测定采用放射免疫法, 按照试剂盒说明书进行操作。计算胰岛素释放指数 (ISI): ISI 以高糖条件下 (16.7 mmol/L 葡萄糖) 细胞培养上清液中的胰岛素浓度与低糖条件下 (3.3 mmol 葡萄糖) 的胰岛素浓度比值表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛 β 细胞株 NIT-1 的生物学活性 胰岛 β 细胞呈贴壁、成簇及不规则生长。胰岛 β 细胞分别在低、高浓度葡萄糖刺激下, 其培养液中胰岛素的水平分别为 (12.720 ± 0.792) μIU/mL, (21.435 ± 1.011) μIU/mL, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.2 PIC 对 NIT-1 细胞增殖的抑制作用 用不同浓度的 PIC (0.1、1、10 μg/mL) 干预 NIT-1 细胞 24 h, 与对照组 (PIC =

0 μg/mL) 相比, 各浓度 PIC 均能抑制 NIT-1 细胞生长, 且作用呈剂量依赖性。在 PIC (0.1、1、10 μg/mL) 浓度刺激下细胞生长程度分别为 (2.395 ± 0.053) (1.841 ± 0.172) (1.479 ± 0.080), 均明显低于对照组的 (2.500 ± 0.020), 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。

2.3 PIC 1 μg/mL 刺激 NIT-1 细胞下的炎症因子表达 PIC 干预组中 IL-1β, IL-6, TNF-α 均高于对照组且差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1。

表 1 PIC 1 μg/mL 刺激 NIT-1 细胞下的炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	6	3.768 ± 0.057	3.631 ± 0.024	3.763 ± 0.080
PIC (1 μg/mL)	6	60.423 ± 9.139	10.025 ± 2.999	74.435 ± 8.527

2.4 PIC 对 NIT-1 细胞胰岛分泌功能的抑制作用 用不同浓度 PIC 干预细胞后, 各组细胞在低糖刺激下基础胰岛分泌水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05), 而在高糖刺激下的胰岛素分泌水平和胰岛素释放指数 ISI 明显下降, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 PIC 对 NIT-1 细胞胰岛分泌功能的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, Piu/mL)

组别	n	低糖	高糖	ISI
对照组	6	12.720 ± 0.792	21.435 ± 1.011	1.685
PIC 0.1 μg/mL	6	12.215 ± 1.365	19.105 ± 0.417	1.564
1 μg/mL	6	11.850 ± 0.580	17.315 ± 0.711	1.461
10 μg/mL	6	11.100 ± 1.216	14.105 ± 0.247	1.270

3 讨论

代谢相关疾病包括肥胖、糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化都存在慢性低水平炎症, 表现为血循环中炎症因子水平升高和局部组织器官炎性细胞浸润。其中炎症反应因子与糖尿病的关系最早由 Hotmamisligil 于 1993 年在动物实验中发现, 随着分子生物学技术的日新月异, 越来越多的研究认为 IL-1β, IL-6 及 TNF-α 等细胞因子浸润胰腺, 可引起胰岛素抵抗 (IR) 和胰岛 β 细胞功能减退, 最终导致胰岛 β 细胞衰竭^[6-7]。这些研究均证实了低度炎症与糖尿病的关系。因此, 对 2 型糖尿病的认识已从糖脂代谢紊乱过渡到免疫和炎症反应损伤。

机体内的天然免疫系统是抵御各种环境威胁如微生物感染和理化损伤的重要屏障, 被视为机体抵抗外界感染的第一道防线。TLRs 作为一类天然免疫受体, 通过 PAMP 对外源性脂多糖 (LPS)、双链 RNA 或内源性热休克蛋白 60 (HSP60), 游离脂肪酸等进行识别, 最终激活干扰素调节因子 3 (IRF3) 和 NF-κB, 释放 IL-1β, IL-6 及 TNF-α 等炎症细胞因子, 在抗感染过程中起着重要作用^[8]。如果 TLRs 过度活化可发生机体免疫损伤, 导致疾病的发生。研究发现, 2 型糖尿病患者血糖水平及 IR 指数与 TLRs 过度活化密切相关^[9-10]。有 3 家实验室相继报道 TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} 小鼠能够抵抗高脂饮食引起的 IR、肝脏、脂肪组织和胰岛炎症^[11-13]。由此可见, TLRs 很可能是连接糖脂毒性和胰岛炎症的关键因子, 同时也是抗炎、免疫治疗靶点。

然而 TLR3 作为 TLRs 家族的另一成员与糖尿病的关系研究却少见报道, TLR3 能够特异性识别病毒 dsRNA 及其类似物 PIC, 在机体抗病毒效应中发挥着重要作用。文献证实,

TLR3 除在免疫细胞有表达外,在体内其他细胞中也有表达,如胰岛 β 细胞、神经细胞等^[14]。PIC 刺激可以抑制神经祖细胞的增殖并诱导其功能障碍^[15];PIC 刺激内皮细胞能明显抑制其增殖并诱导细胞凋亡^[4]。然而胰岛 β 细胞上 TLR3 被激活,是否影响其细胞增殖及生物学功能却并不清楚。本研究结果表明,胰岛 β 细胞 TLR3 被激活后,能诱导大量炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 合成和释放,进而抑制胰岛 β 细胞增殖及胰岛素的释放。此外,研究结果与 TLR3 信号传导,调节下游炎症因子释放机制相吻合。

综上所述,胰岛 β 细胞 TLR3 被激活,可抑制胰岛 β 细胞增殖,推测其在 1 型或 2 型糖尿病 β 细胞衰竭中起着重要作用。后续的实验可进一步在基因水平观察激活 TLR3 对胰岛 β 细胞功能的影响。本研究将有助于更全面地认识 TLR3 信号对胰岛 β 细胞功能的调节作用,并为糖尿病的预防和治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Ehses JA, Meier DT, Wuest S, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(8):1795-1806.
- [2] Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review[J]. *J Oral Sci*, 2011, 53(3):263-271.
- [3] Bruno ME, Frantz AL, Rogier EW, et al. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor by the classical and alternative NF- κ B pathways in intestinal epithelial cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(4):468-478.
- [4] Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, et al. Activation of endothelial Toll-Like receptor 3 impairs endothelial function [J]. *Circ Res*, 2011, 108(11):157-158.
- [5] Santini E, Fallahi P, Ferrari SM, et al. Effect of PPAR-Activation and inhibition on Glucose-Stimulated insulin release in INS-1e cells[J]. *Diabetes*, 2004, 53(3):79-83.
- [6] Hu FB, Meigs JB, Li TY, et al. Inflammatory markers and

risk of developing type 2 diabetes in women[J]. *Diabetes*, 2004, 53(5):693-700.

- [7] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B[J]. *Nat Med*, 2005, 11(2):183-190.
- [8] Yamamoto OM, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adapt or TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway[J]. *Science*, 2003, 301(5633):640-643.
- [9] Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects [J]. *Diabetes*, 2008, 57(10):2595-2602.
- [10] Dasu MR, Devaraj S, Park S, et al. Increased Toll-Like receptor(TLR)activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(4):861-868.
- [11] Himes RW, Smith CW. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model [J]. *FASEB J*, 2010, 24(3):731-739.
- [12] Kuo LH, Tsai PJ, Jiang MJ, et al. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(1):168-179.
- [13] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11):3015-3025.
- [14] Wen L, Peng J, Li ZJ, et al. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of toll-like receptors on pancreatic islets [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5):3173-3180.
- [15] Lathia JD, Okun E, Tang SC, et al. Toll-Like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(51):13978-13984.

(收稿日期:2014-03-12 修回日期:2014-06-07)

(上接第 2809 页)

- 疗与护理培训教材[M].北京:北京大学医学出版社,2003:64-83.
- [2] 刘彦春,李杏红,李兴旺,等.北京地坛医院 HIV/AIDS 首诊患者 690 例临床分析[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2008, 22(2):98-99.
 - [3] 戴懿,李太生,王爱霞,等.143 例首诊发现的中国艾滋病患者临床特征分析[J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28(5):651.
 - [4] Avcin T, Toplak N. Antiphospholipid antibodies in response to infection[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2007, 23(9):212-218.
 - [5] Metlas R, Srdic T, Veljkovic V. Anti-IgG antibodies from sera of healthy individuals neutralize HIV-1 primary isolates[J]. *Curr HIV Res*, 2007, 20(5):261-265.
 - [6] Haynes BF, Nicely NI, Alam SM. HIV-1 autoreactive antibodies: are they good or bad for HIV-1 prevention[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 37(17):543-545.
 - [7] Hernandez GT, Critchfield JM, Rodriguez RA. Interpreta-

tion of serologic tests in an HIV-infected patient with kidney disease[J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 17(2):708-712.

- [8] Shoenfeld Y, Blank M, Abu-Shakra M, et al. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases [J]. *Isr Med Assoc J*, 2008, 27(10):13-19.
- [9] Adeyemi OM, Attar B, Jensen D, et al. Serological markers of autoimmunity in patients infected with hepatitis C virus: impact of HIV co-infection [J]. *HIV Med*, 2005, 6(6):371-374.
- [10] [美]利维(Jay A. Levy), 邵一鸣. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2010:250-254.
- [11] Cuellar ML, Espinoza LR. Rheumatic manifestations of HIV-AIDS [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2000, 14(7):579-593.

(收稿日期:2014-02-11 修回日期:2014-04-17)