

· 论著 ·

短肽 FLPNF 抑制大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞内 hIAPP 聚集的研究

石悦 焦奥 林建贞 张城硕 孙宁 张佳林

中国医科大学附属第一医院肝胆外科暨器官移植科, 沈阳 110001

通信作者: 张佳林, Email: jlz2000@yeah.net

【摘要】 目的 探讨自行设计并合成的短肽FLPNF抑制过表达人胰岛淀粉样多肽(hIAPP)的大鼠胰岛素瘤INS-1细胞内hIAPP的聚集作用和机制,及其对hIAPP-INS-1细胞增殖活力及胰岛素分泌功能的保护作用。**方法** 以慢病毒转染人hIAPP基因构建的hIAPP-INS-1细胞株为研究对象,用不同浓度的FLPNF处理hIAPP-INS-1细胞并分组,硫黄素T染色法检测细胞内hIAPP的聚集情况,MTS法检测细胞增殖活力,ELISA法检测细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能;根据FLPNF、脑啡肽酶抑制剂单独及联合处理hIAPP-INS-1细胞分组,应用酶活性测定法检测FLPNF对脑啡肽酶活性的影响及硫黄素T染色法检测细胞内hIAPP的聚集情况。**结果** 与空白对照组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ FLPNF可以明显抑制细胞内hIAPP聚集,绿色荧光强度明显降低($F=14.442, P<0.01$),细胞的增殖活力明显增加($F=4.151, P<0.01$),葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能有升高趋势($F=0.603, P>0.05$)。FLPNF可使hIAPP-INS-1细胞内脑啡肽酶活性明显增加,为空白对照组的2.356倍($F=84.265, P<0.01$)。同时加入脑啡肽酶抑制剂时,FLPNF抑制hIAPP聚集的作用较单独加入FLPNF组明显降低($F=9.868, P<0.01$)。**结论** FLPNF在hIAPP-INS-1细胞内可以通过增强脑啡肽酶活性,抑制hIAPP的聚集,对细胞的增殖活力及胰岛素分泌功能具有一定的保护作用。

【关键词】 人胰岛淀粉样多肽;FLPNF;脑啡肽酶;2型糖尿病

基金项目: 辽宁省科学技术厅项目(2017225031)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.06.004

Study of reduction of hIAPP aggregation by short peptide FLPNF in INS-1 cells Shi Yue, Jiao Ao, Lin Jianzhen, Zhang Chengshuo, Sun Ning, Zhang Jialin. Hepatobiliary Surgery Department and Unit of Organ Transplantation, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Zhang Jialin, Email: jlz2000@yeah.net

【Abstract】 Objective To investigate the effect and its mechanism of self-designed short peptide FLPNF on the aggregation of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) in hIAPP-INS-1 cells. The protective effect of FLPNF on cell proliferation and insulin secretion function in hIAPP-INS-1 cells were also studied.

Methods The hIAPP-INS-1 cell line was constructed by lentiviral transfection of human hIAPP gene. The cells were treated with different concentrations of FLPNF. The effect of FLPNF on the inhibition of hIAPP amyloid aggregation was tested by Thioflavin T staining. The proliferation of hIAPP-INS-1 cells was tested by MTS assay. The glucose-stimulated insulin secretion function was detected by ELISA. Furthermore, cells were grouped into FLPNF group, neprilysin group or FLPNF in combination with neprilysin group. Influence of FLPNF on the enzymatic activity of neprilysin was examined by enzyme activity assay and intracellular hIAPP aggregation was detected using Thioflavin T staining. **Results** Compared with control group, 200 $\mu\text{mol/L}$ FLPNF significantly inhibited the intracellular hIAPP aggregation, and the intensity of green fluorescence intensity were decreased ($F=14.442, P<0.01$). Furthermore, the cell proliferation activity was increased ($F=4.151, P<0.01$), and the glucose-stimulated insulin secretion function was improved ($F=0.603, P>0.05$) by FLPNF. The neprilysin activity of hIAPP-INS-1 cells in FLPNF group was 2.356 times that of control group ($F=84.265, P<0.01$). When combined with neprilysin inhibitor, the effect of FLPNF on the inhibition of hIAPP aggregation was significantly decreased compared with that in FLPNF

group ($F=9.868$, $P<0.01$). **Conclusion** FLPNF can inhibit the intracellular hIAPP aggregation in hIAPP-INS-1 cells by enhancing neprilysin activity, and has a protective effect on cell proliferation and glucose-stimulated insulin secretion function in hIAPP-INS-1 cells.

【Key words】 Human islet amyloid polypeptide; FLPNF; Neprilysin; Type 2 diabetes mellitus

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.06.004

人胰岛淀粉样多肽(hIAPP)是由胰岛 β 细胞分泌的一种激素,由37个氨基酸构成^[1]。hIAPP与胰岛素共同存储在 β 细胞分泌囊泡中,并以固定比例同步分泌^[2]。生理条件下,hIAPP有协助调节人体血糖水平的功能。单体hIAPP无细胞毒性,但其在病理条件下有极强的自我聚集倾向,聚集过程中形成的寡聚体及富含 β -折叠结构的淀粉样聚集体可以对 β 细胞的功能造成损害^[3],并导致2型糖尿病和胰岛移植物的功能失活^[4]。

脑啡肽酶属于中性内肽酶M13家族,为细胞表面的含锌离子(Zn^{2+})的II型膜蛋白。国外多项研究表明,脑啡肽酶能够水解hIAPP以抑制其聚集,从而保护 β 细胞功能^[5]。Glutaryl-Ala-Ala-Phe-4-methoxy-2-naphthylamine (GAAP-4-MNA)是脑啡肽酶的特异性水解底物^[6]。

硫黄素T是一种荧光染料,较容易与富含 β -折叠结构的分子结合,改变其光学性质,从而在蓝色激发光下发出绿色荧光,可用来探测hIAPP形成的淀粉样聚集体。本研究团队的前期研究针对hIAPP容易形成聚集的第11~15位氨基酸位点自行设计并在体外合成一种短肽,其序列为FLPNF(苯丙氨酸-亮氨酸-脯氨酸-天冬氨酸-苯丙氨酸),并应用硫黄素T染色发现其可以在缓冲液中抑制hIAPP形成聚集,其原理为直接结合hIAPP,从而抑制hIAPP的自身聚集^[7]。但FLPNF能否抑制细胞内hIAPP的聚集及其机制尚不清楚。本研究旨在探讨FLPNF对细胞内hIAPP聚集,及对细胞增殖活力、胰岛素分泌功能的影响,并且通过酶活性测定法探讨FLPNF在细胞内通过增加脑啡肽酶的活性来抑制hIAPP形成聚集,同时应用以往报道中能够在缓冲液中促进hIAPP形成聚集的短肽NFGAIL作为阴性对照短肽进行研究,为进一步探索FLPNF对2型糖尿病的防治作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 大鼠胰岛素瘤细胞株INS-1购自上海拜力生物科技有限公司,为本实验室冻存;hIAPP-INS-1细胞株,及空转染慢病毒的细胞株CON-INS-1为本实验室冻存^[8]。复苏后的上述细胞

均培养于RPMI1640培养基中,添加10 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 μ mol/L β -巯基乙醇、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素及100 μ g/ml 链霉素^[9]。细胞培养皿静置于37℃含5% CO_2 的湿润培养箱中培养。

1.2 试剂与仪器 RPMI1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)等购自Hyclone公司; β 巯基乙醇购自上海棋成实业有限公司;硫黄素T、脑啡肽酶水解底物GAAP-4-MNA、亮氨酸氨肽酶(L-AP)、脑啡肽酶抑制剂——麟酰二肽、MES 缓冲液、脱氧胆酸钠、氟化钠、焦磷酸钠、甘油等均购自上海Sigma-Aldrich公司;HEPES液、氯化钠、Triton X-100、乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)、正钒酸钠、氯化镁、苯甲基磺酰氟(PMSF)等均购自上海碧云天生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)购自江苏凯基生物科技股份有限公司;多聚甲醛购自武汉赛维尔生物科技有限公司;短肽FLPNF、短肽NFGAIL购自上海强耀生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)等购自北京索莱宝科技有限公司;MTS试剂盒购自Promega公司;大鼠胰岛素ELISA检测试剂盒购自Mercodia公司;二氧化碳细胞培养箱、化学发光仪为美国Thermo Scientific公司生产;倒置相差显微镜为日本Nikon公司生产;深低温冰箱为日本Sanyo公司生产;全自动酶标仪为瑞士SUNRISERC公司生产;荧光显微镜为上海中恒公司生产。

1.3 实验分组与处理 10 μ l DMSO 溶液溶解FLPNF及NFGAIL,并分装备用;麟酰二肽用10 μ l DMSO 溶液溶解备用;硫黄素T称重并用甲醇溶解备用。

验证hIAPP-INS-1细胞中的hIAPP聚集情况实验分为3组,分别为INS-1对照组、CON-INS-1对照组及hIAPP-INS-1组;FLPNF对hIAPP-INS-1细胞内hIAPP聚集、增殖活力及胰岛素分泌功能的影响实验按照加入的短肽FLPNF浓度分为0 μ mol/L组、100 μ mol/L组、200 μ mol/L组、400 μ mol/L组及800 μ mol/L组,加入不同浓度的NFGAIL为阴性对照组,加入药物处理时间为72 h;脑啡肽酶活性测定实验分为空白对照组、FLPNF组、NFGAIL组及麟酰二

肽组;FLPNF通过增强脑啡肽酶活性抑制hIAPP的聚集实验分为空白对照组、FLPNF组、FLPNF + 磷酸二肽组、NFGAIL组、NFGAIL + 磷酸二肽组及磷酸二肽组,各组细胞经药物处理时间为 72 h,其中FLPNF + 磷酸二肽组及NFGAIL + 磷酸二肽组采用FLPNF或NFGAIL与磷酸二肽同时处理细胞的方式添加,FLPNF及NFGAIL的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,磷酸二肽浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.4 硫黄素 T 荧光染色 取对数生长期细胞,按照 2×10^5 细胞/孔接种到 12 孔培养板,每个实验条件设置 3 个复孔。待细胞贴壁后,给与相应的药物处理后,PBS 洗去细胞培养板中的培养液和死细胞,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,20 $\mu\text{mol/L}$ 硫黄素 T 染色,避光作用 8 min,70% 酒精清洗 1 次,PBS 缓冲液清洗 1 次,室温静置 30 min,荧光显微镜观察荧光并拍照。

取药物处理后的对数生长期细胞消化后以 1×10^4 细胞/孔接种到黑色 96 孔荧光板中,每个实验条件设置 3 个复孔。待细胞贴壁后,行硫黄素 T 荧光染色,染色方法同前。染色后将 96 孔荧光板放入化学发光仪中测定激发/发射波长:435 nm/485 nm 处的荧光强度值,得到每 10 000 个细胞的荧光强度,制作柱形图并统计分析。

1.5 MTS 法测定细胞增殖活力 取药物处理后的对数生长期细胞,消化后以 2×10^3 细胞/孔接种到 96 孔培养板中,每组细胞设置 3 个复孔。置培养箱中培养 48 h,每孔加入 10 μl MTS 溶液,于 37℃ 细胞培养箱中继续培养 2 h。待 MTS 孵育结束后,将 96 孔板放入酶标仪中测定各孔在 490 nm 处的吸光度值。

1.6 ELISA 法检测葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能 取对数生长期细胞,消化后以 2×10^3 细胞/孔接种到 96 孔培养板中,每组细胞设置 3 个复孔。经药物处理后,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,每孔加入不含葡萄糖的 KRBH 液 100 μl ,于 37℃ 细胞孵箱中孵育 30 min,弃除 KRBH 液后再用含有低糖 (2 mmol/L) 或高糖 (20 mmol/L) 的 KRBH 液孵育 1 h,抽出孵育液至离心管中,12 000 r/min,离心半径 4 cm,离心 10 min,收集上清液作为胞外样品;同时细胞板各孔加入 100 μl 的 RIPA 裂解液,吹打均匀后,抽出裂解液至离心管中,12 000 r/min,离心半径 4 cm,离心 10 min,收集上清液作为胞内样品。在 96 孔板中加入标准品或样品,每孔 50 μl ,稀释标准品,制作标准曲线。每孔加入样品稀释液 40 μl

及样品 10 μl ,空白对照孔加入样品稀释液 40 μl 及完全培养基 10 μl ,封闭后 37℃ 孵箱中孵育 30 min。每孔 300 μl 洗涤液连续洗涤 5 次。弃除洗涤液后,各孔加入酶标试剂 50 μl ,空白对照孔中不加。封闭后 37℃ 孵箱中孵育 30 min。每孔 300 μl 洗涤液连续洗涤 5 次。弃除洗涤液后,每孔加入显色剂 A 与显色剂 B 各 50 μl ,混匀后于室温避光静置 15 min。显色后每孔加入终止液 50 μl ,将 96 孔板放入酶标仪中测定各孔在 450 nm 处的吸光度值。分别计算各组在低糖或高糖孵育下的胞外与胞内样品吸光度值的比值,作为各组胰岛素分泌量占胞内胰岛素含量的百分比,进行统计分析。

1.7 脑啡肽酶活性测定 取对数生长期的 hIAPP-INS-1 细胞,消化后以 5×10^5 细胞/孔接种到 6 孔培养板中,每组细胞设置 3 个复孔。细胞贴壁后,加入 FLPNF、NFGAIL 或磷酸二肽处理 24 h。PBS 洗去细胞培养板中的死细胞。加入裂解液 (50 mmol/L HEPES 液, pH 7.4, 150 mmol/L 氯化钠, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L EGTA, 1.5 mmol/L 氯化镁, 1 mmol/L 正钒酸钠, 100 mmol/L 氟化钠, 10 mmol/L 焦磷酸钠, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF), 冰上裂解细胞 5 min; 将裂解液移入离心管中, 12 000 r/min ($r = 4 \text{ cm}$), 离心 15 min; 取上清, 进行蛋白定量。

取黑色 96 孔荧光板, 每组加入经定量并稀释成 3 g/L 的蛋白样品 10 μl , 每组设置 3 个复孔。每孔反应体系为 100 μl (含 MES 缓冲液 20 mmol/L, GAAF-4-MNA 100 $\mu\text{mol/L}$), 避光反应 0 min 及 30 min, 再加入 0.3 g/L 的 L-AP10 μl , 避光反应 10 min。化学发光仪分别测定激发波长 340 nm, 吸收波长 425 nm 下, 各孔在 30 min 与 0 min 的荧光强度值的差值, 并与空白对照组的比值作为相对荧光强度, 绘制柱形图并统计分析。

1.8 统计学处理 数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对每组数据进行正态性检验后, 3 组及 3 组以上组间均数比较采用单因素方差分析 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hIAPP 在 hIAPP-INS-1 细胞中的聚集情况及对细胞增殖活力、胰岛素分泌功能的影响 在细胞贴壁并孵育 48 h 后, 荧光显微镜下 hIAPP-INS-1 组细胞的胞内绿色荧光显著强于 INS-1 对照组及 CON-INS-1

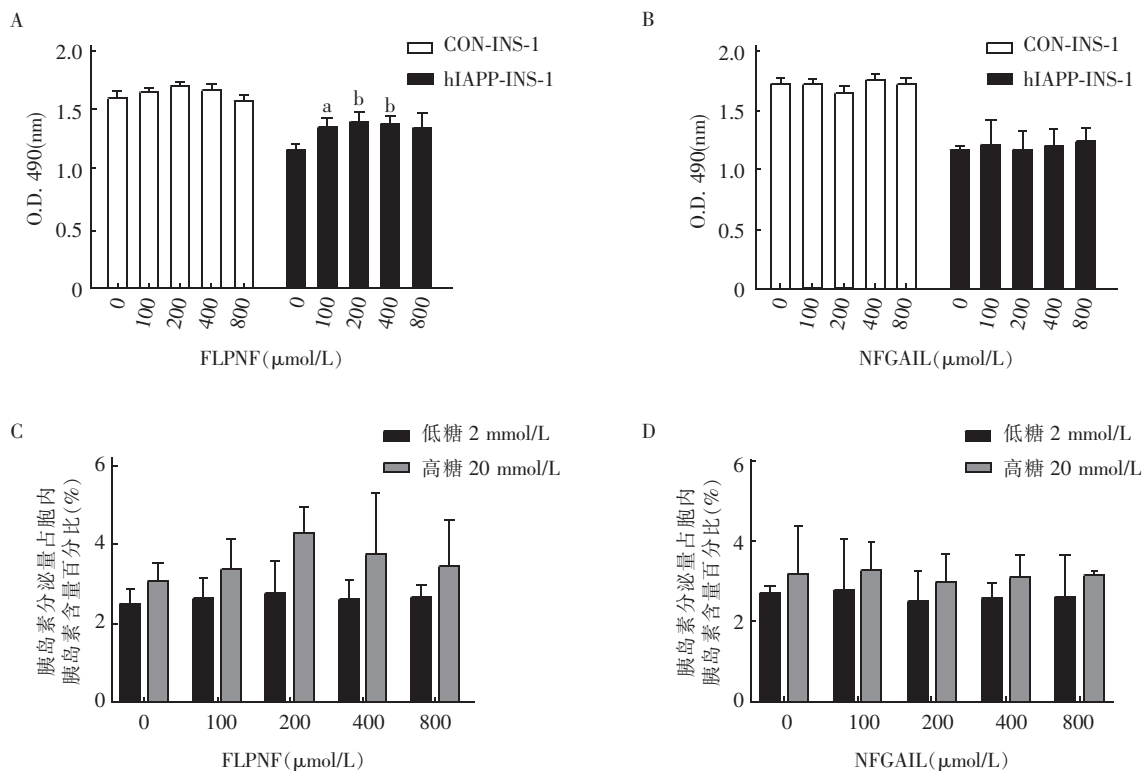
组,化学发光仪测定显示 hIAPP-INS-1 组细胞荧光强度较 INS-1 对照组及 CON-INS-1 对照组明显增强 ($F=367.750, P<0.01$),见图 1A(插 1)。在细胞贴壁 48 h 后 hIAPP-INS-1 组细胞增殖活力较 INS-1 对照组及 CON-INS-1 对照组显著降低 ($F=8.388, P<0.05$),见图 1B(插 1)。ELISA 法检测葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能结果显示,细胞贴壁 48 h 后,与 INS-1 对照组及 CON-INS-1 对照组相比, hIAPP-INS-1 组细胞在高糖环境下的胰岛素分泌量有降低的趋势 ($F=3.058, P>0.05$),见图 1C(插 1)。

2.2 不同浓度 FLPNF 对 hIAPP-INS-1 细胞内 hIAPP 聚集的影响 图 2A(插 2)为硫黄素 T 染色下,荧光显微镜观察加入不同浓度 FLPNF 对 hIAPP-INS-1 细胞胞内绿色荧光的影响;图 2C(插 2)为化学发光仪检测上述各组荧光强度的变化情况。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,加入不同浓度 FLPNF (100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、800 $\mu\text{mol/L}$) 后,100 $\mu\text{mol/L}$ 组较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组的荧光强度显著降低 ($F=14.442, P<0.05$);与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ 组、400 $\mu\text{mol/L}$ 及 800 $\mu\text{mol/L}$ 组的荧光强度降低则更为明显 ($F=14.442, P<0.05$),且后 3 组的绿色荧光

强度差异不明显,由此可见 FLPNF 抑制 hIAPP 聚集的作用浓度以 200 $\mu\text{mol/L}$ 为宜。而如图 2B、2D(插 2)所示,加入不同浓度 NFGAIL 后, hIAPP-INS-1 细胞胞内绿色荧光强度均较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著变化 ($F=0.312, P>0.05$)。

2.3 FLPNF 对 hIAPP-INS-1 细胞增殖活力及胰岛素分泌功能的影响 图 3A 为 MTS 法检测加入不同浓度 FLPNF 及 NFGAIL 对 CON-INS-1 细胞及 hIAPP-INS-1 细胞增殖活力的影响。结果显示,在 hIAPP-INS-1 细胞中加入不同浓度 FLPNF (100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、800 $\mu\text{mol/L}$) 后,细胞活力较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组均升高;其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 组较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组有显著差异 ($F=4.151, P<0.05$),200 $\mu\text{mol/L}$ 及 400 $\mu\text{mol/L}$ 组较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组差异更明显 ($F=4.151, P<0.05$);而加入不同浓度 FLPNF 后, CON-INS-1 细胞增殖活力无明显变化 ($F=2.991, P>0.05$)。结果表明,FLPNF 可能通过抑制 hIAPP 的聚集从而对细胞增殖活力起到保护作用。而如图 3B 所示,加入不同浓度 NFGAIL 后,两种细胞增殖活力均较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著变化。

hIAPP-INS-1 细胞培养基中加入不同浓度 FLPNF



注:A:MTS法测定不同浓度 FLPNF 对 CON-INS-1 细胞及 hIAPP-INS-1 细胞增殖的影响;B:MTS法测定不同浓度 NFGAIL 对 CON-INS-1 细胞及 hIAPP-INS-1 细胞增殖的影响;C:ELISA 法测定不同浓度 FLPNF 对 hIAPP-INS-1 细胞胰岛素分泌功能的影响;D:ELISA 法测定不同浓度 NFGAIL 对 hIAPP-INS-1 细胞胰岛素分泌功能的影响;与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,^a $P<0.05$;与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,^b $P<0.01$;O.D.:吸光度值;hIAPP:人胰淀粉样多肽

图 3 FLPNF 及 NFGAIL 对细胞增殖活力及胰岛素分泌功能的影响

及NFGAIL后,ELISA法测定低糖及高糖环境下,胞内及胞外胰岛素含量。如图 3C 所示,在低糖(2 mmol/L)条件下,加入不同浓度FLPNF及NFGAIL(100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L、800 μ mol/L)与 0 μ mol/L 组的胰岛素分泌量差异无统计学意义;在高糖(20 mmol/L)刺激下,加入不同浓度FLPNF各组的胰岛素分泌量虽然无显著增加,但有增加的趋势($F=0.603, P>0.05$),其中200 μ mol/L组在高糖刺激下的胰岛素分泌量占胞内胰岛素含量的比例最高。如图 3D 所示,在高糖(20 mmol/L)刺激下,加入不同浓度NFGAIL各组较0 μ mol/L组胰岛素分泌量无增高趋势($F=0.066, P>0.05$)。

2.4 FLPNF 通过增强脑啡肽酶活性抑制 hIAPP 的聚集 图 4A(插 1)为酶活性测定法检测FLPNF对hIAPP-INS-1 细胞内脑啡肽酶活性的影响。200 μ mol/L FLPNF及NFGAIL分别加入hIAPP-INS-1 细胞培养基中,培养 24 h 后,FLPNF组脑啡肽酶活性增加程度为空白对照组的 2.356 倍,有显著差异($F=84.265, P<0.01$);而NFGAIL组脑啡肽酶活性的增加则较空白对照组无明显差异。培养基中加入磷酸二肽 50 μ mol/L作为阴性对照组(磷酸二肽组),结果脑啡肽酶活性较空白对照组显著降低(0.103 倍, $F=84.265, P<0.01$)。通过硫黄素 T 染色后化学发光仪检测各组hIAPP-INS-1 细胞胞内的荧光强度,验证FLPNF通过增强脑啡肽酶活性影响hIAPP的聚集。结果如图 4B(插 1)所示,FLPNF组荧光强度较空白对照组显著降低($P<0.05$);FLPNF + 磷酸二肽组荧光强度较空白对照组稍有增加,但无统计学差异($P>0.05$),但相比之下较FLPNF组明显增加($F=9.868, P<0.05$),而相比磷酸二肽组仍有所降低。加入对照短肽NFGAIL组荧光强度较空白对照组无明显差异($P>0.05$),NFGAIL + 磷酸二肽组荧光强度较空白对照组升高明显($F=9.868, P<0.05$)。图 4C(插 1)为应用荧光显微镜观察上述各组绿色荧光情况,FLPNF组胞内绿色荧光较空白对照组降低,而FLPNF + 磷酸二肽组较FLPNF组绿色荧光增加。

3 讨论

hIAPP 是 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞胞外形成淀粉样聚集的主要成分,其聚集过程中形成的可溶性寡聚体及不溶性纤维淀粉状沉积可导致 β 细胞的死亡^[10]。因此,抑制hIAPP聚集的形成将成为开发治疗 2 型糖尿病及保护胰岛移植功能的相关药

物的主要策略之一。很多研究表明,有些短肽能够抑制 hIAPP 形成淀粉样聚集^[11-12]。但是目前短肽类抑制剂抑制 hIAPP 聚集的具体机制尚不十分清楚。

本研究团队根据 hIAPP 容易形成聚集的氨基酸位点自行设计了短肽FLPNF,前期研究结果表明,此短肽在缓冲液中具有抑制hIAPP形成聚集的作用,这种作用机制为FLPNF与hIAPP的直接结合^[7]。但FLPNF在胞内抑制hIAPP聚集的作用机制尚不明确。

通过硫黄素 T 染色结果可以观察到前期构建的hIAPP-INS-1 细胞可稳定表达 hIAPP,且由于hIAPP 的聚集导致细胞增殖活力及胰岛素分泌功能受损。在本研究中,FLPNF能够显著抑制hIAPP在胞内的聚集,虽然细胞内 hIAPP 并未完全被抑制,但相对于阴性对照短肽NFGAIL,已经有了很大程度的降低。且比较不同浓度,200 μ mol/L FLPNF可抑制hIAPP 聚集,而 100 μ mol/L FLPNF 的作用较 200 μ mol/L组差,400 μ mol/L、800 μ mol/L FLPNF的效果与200 μ mol/L FLPNF抑制 hIAPP 聚集作用差异无统计学意义,所以200 μ mol/L为FLPNF的最适浓度。

在hIAPP-INS-1细胞内,通过 MTS 法及ELISA法观察到细胞经不同浓度FLPNF处理后,细胞的增殖活力得到改善,高糖刺激下胰岛素分泌量有增加的趋势。与硫黄素 T 染色结果类似,200 μ mol/L FLPNF能起到较好的保护hIAPP-INS-1 细胞活力及功能的作用。而对于阴性对照的CON-INS-1 细胞,不同浓度的FLPNF对细胞增殖活力均无明显改善,说明FLPNF通过抑制胞内的hIAPP聚集,减轻了hIAPP 形成的寡聚体及淀粉样聚集对细胞增殖活力的损害。

在胰岛 β 细胞中有多种途径可以促进hIAPP的降解,包括自噬-溶酶体途径、泛素-蛋白酶体途径及胞内直接水解hIAPP的蛋白酶,如脑啡肽酶、胰岛素降解酶等。其中脑啡肽酶由 742 个氨基酸组成,有研究报道,脑啡肽酶能够水解体内的肽包括脑啡肽、速激肽、P 物质、内皮素、缓激肽和心房钠利尿肽等^[13]。脑啡肽酶的活性测定方法国内外也有很多文献报道,利用其水解底物 GAAF-4-MNA、GAAF-AMC或Suc-AAF-AMC来测定^[6]。本研究选用底物GAAF-4-MNA,应用酶活性测定法验证FLPNF可显著增强细胞内脑啡肽酶的活性。进一步采用脑啡肽酶抑制剂磷酸二肽验证了FLPNF能够通过影响

脑啡肽酶的活性,使hIAPP的聚集减少。FLPNF + 磷酸二肽组hIAPP聚集量较FLPNF组明显增多,证明FLPNF抑制hIAPP聚集功能在一定程度上是通过影响脑啡肽酶的活性实现的。另一方面,FLPNF + 磷酸二肽组与磷酸二肽组相比,hIAPP的聚集量仍然有减少的趋势,说明FLPNF不仅通过脑啡肽酶抑制hIAPP聚集,还可能通过其他方式减少hIAPP的聚集。在本研究中,针对FLPNF增强脑啡肽酶的活性只进行了初步的探索,然而FLPNF具体通过何种方式增强脑啡肽酶的活性,还需进一步的研究来证实。

本研究应用过表达 hIAPP 的大鼠胰岛素瘤细胞作为研究对象,证实FLPNF能够抑制hIAPP-INS-1细胞中的hIAPP的聚集,具有明显的保护hIAPP-INS-1细胞增殖活力的作用,并能够改善细胞的胰岛素分泌功能,并且进一步证明了FLPNF可通过增强脑啡肽酶的活性来减少细胞内hIAPP的聚集。在以后的研究中,需进一步行动物体内研究证实其作用,还可以在此短肽序列的基础上应用如聚乙二醇修饰等方法来增强短肽的稳定性,或加入其他修饰增强FLPNF的抑制效能^[14-15]。本研究从细胞层面探讨和证明了FLPNF抑制hIAPP聚集及对胰岛细胞功能的保护作用,为开发更加经济、高效的 hIAPP 聚集抑制剂奠定基础,可能在 2 型糖尿病的预防和治疗方面具有较好的应用前景和临床意义。

参 考 文 献

- [1] Hay DL, Chen S, Lutz TA, et al. Amylin: pharmacology, physiology, and clinical potential [J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67 (3): 564-600. DOI: 10.1124/pr.115.010629.
- [2] Green J, Goldsby C, Mini T, et al. Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin [J]. *J Mol Biol*, 2003, 326 (4): 1147-1156. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)01377-3.
- [3] Lopes DH, Attar A, Nair G, et al. Molecular tweezers inhibit islet amyloid polypeptide assembly and toxicity by a new mechanism [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10 (6): 1555-1569. DOI: 10.1021/acschembio.5b00146.
- [4] Denroche HC, Verchere CB. IAPP and type 1 diabetes: implications for immunity, metabolism and islet transplants [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60 (2): R57-R75. DOI: 10.1530/JME-17-0138.
- [5] Zraika S, Aston-Mourney K, Marek P, et al. Neprilysin impedes islet amyloid formation by inhibition of fibril formation rather than peptide degradation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (24): 18177-18183. DOI: 10.1074/jbc.M109.082032.
- [6] Chin-Chan M, Segovia J, Quintanar L, et al. Mercury reduces the enzymatic activity of neprilysin in differentiated SH-SY5Y cells [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 145 (1): 128-137. DOI: 10.1093/toxsci/kfv037.
- [7] Shi Y, Lv W, Jiao A, et al. A novel pentapeptide inhibitor reduces amyloid deposit formation by direct interaction with hIAPP [J]. *Int J Endocrinol*, 2019, 2019: 9062032. DOI: 10.1155/2019/9062032.
- [8] Lv W, Zhang J, Jiao A, et al. Resveratrol attenuates hIAPP amyloid formation and restores the insulin secretion ability in hIAPP-INS1 cell line via enhancing autophagy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97 (2): 82-89. DOI: 10.1139/cjpp-2016-0686.
- [9] Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, et al. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells [J]. *Diabetes*, 2003, 52 (11): 2701-2709. DOI: 10.2337/diabetes.52.11.2701.
- [10] Johnson KH, O'Brien TD, Betsholtz C, et al. Islet amyloid polypeptide: mechanisms of amyloidogenesis in the pancreatic islets and potential roles in diabetes mellitus [J]. *Lab Invest*, 1992, 66 (5): 522-535.
- [11] Porat Y, Mazor Y, Efrat S, et al. Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions [J]. *Biochemistry*, 2004, 43 (45): 14454-14462. DOI: 10.1021/bi048582a.
- [12] Wijesekara N, Ahrens R, Wu L, et al. Islet amyloid inhibitors improve glucose homeostasis in a transgenic mouse model of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17 (10): 1003-1006. DOI: 10.1111/dom.12529.
- [13] Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, et al. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon [J]. *J Mol Biol*, 2000, 296 (2): 341-349. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3492.
- [14] Di Bisceglie AM, Janczewska-Kazek E, Habersetzer F, et al. Efficacy of immunotherapy with TG4040, peg-interferon, and ribavirin in a phase 2 study of patients with chronic HCV infection [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147 (1): 119-131. e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.03.007.
- [15] Hamley IW. PEG-peptide conjugates [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15 (5): 1543-1559. DOI: 10.1021/bm500246w.

(收稿日期:2019-03-20)

(本文编辑:饶颖)

· 消息 ·

2020 年第 1 期部分文题介绍

1. 2 型糖尿病合并下肢动脉疾病患者血清 FGF-23 与 OC 的关系研究 2. 1 型糖尿病患者尿酸水平与血脂异常的相关性研究 3. 低滴度 TRAb 甲状腺毒症患者 TRAb 水平与甲状腺摄碘率的相关性研究 4. 放射性碘 131 治疗对甲亢患者性激素、甲状腺功能及 TNF- α 、ET-1 的影响分析 5. 运动对胰岛 β 细胞功能的影响 6. 低升糖指数饮食与糖尿病血糖及血脂控制关系 7. 二甲双胍降低 T2DM 血清维生素 B12 的研究进展 8. 串联质谱法检测尿皮质醇和唾液皮质醇在库欣综合征诊断中的研究进展

本刊编辑部