

前列腺素 $F_{2\alpha}$ 增强膜去极化和升高胞内钙促进 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌叶春玲^{1*}, 袁振宇¹, 任省华¹, 叶涛², 钟玲¹, 蒋家华³(暨南大学 1. 药学院药理学教研室, 2. 华侨医院, 广东 广州 510632; 3. 多伦多大学
医学院生理实验室, 加拿大 多伦多)

摘要: 目的 探讨前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 促进 NIT-1 β 细胞葡萄糖刺激性胰岛素分泌的作用机制。方法 放射免疫法检测 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌量; 激光共聚焦显微镜检测细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果 葡萄糖浓度为 $16.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $PGF_{2\alpha}$ $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或钾通道阻断剂四乙胺 (TEA) $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均使 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌明显增加, 而先给予 TEA 后再加 $PGF_{2\alpha}$ 或先给 $PGF_{2\alpha}$ 再加 TEA 均不能使胰岛素分泌进一步增加。葡萄糖浓度为 $5.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $PGF_{2\alpha}$ 不能使胰岛素分泌增加, 预先给予 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEA 再应用 $PGF_{2\alpha}$, 胰岛素分泌显著增加。 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 和 $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氮嗪使细胞膜处于最大去极化状态时, $PGF_{2\alpha}$ 不能促进胰岛素分泌。 $16.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖浓度下, 预先给予氯通道阻断剂 4,4'-二异硫氰酸水合茛-2,2'-二磺酸 (DIDS), $PGF_{2\alpha}$ 不能促进胰岛素分泌。另外, $16.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖下, $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $PGF_{2\alpha}$ 引起 NIT-1 β 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 而预先给予 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 和 $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氮嗪后再给予 $PGF_{2\alpha}$ 不能引起细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高; 在 DIDS 作用下, NIT-1 β 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著降低, 恢复静息期后给予 $PGF_{2\alpha}$, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 再次降低。结论 促进细胞膜去极化在 $PGF_{2\alpha}$ 增强胰岛素分泌中起着重要作用。 $PGF_{2\alpha}$ 可能通过激活氯通道, 增强 NIT-1 β 细胞膜去极化, 升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 促进高浓度葡萄糖刺激下的胰岛素分泌。

关键词: 前列腺素 $F_{2\alpha}$; 胰岛素; 细胞, NIT-1 β ; 钙, 细胞内; 氯通道

中图分类号: R977.1⁺5

来稿日期: 2005-06-23 接受日期: 2005-12-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (04010463); 国家自然科学基金资助项目 (30070873)

作者简介: 叶春玲, 博士, 教授。

* 联系作者 E-mail: YCL0412@tom.com Tel: (020) 85220261

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)02-0096-06

糖尿病早期循环系统内前列腺素 $F_{2\alpha}$ (prostaglandin $F_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) 显著升高, 并且使糖尿病机体小血管舒缩性明显改变^[1]。但是, 糖尿病早期升高的 $PGF_{2\alpha}$ 对胰岛素分泌影响的研究颇少, 仅有的研究主要集中在 20 世纪 80 年代以前^[2,3]。当时研究认为, 给予 $PGF_{2\alpha}$ 能够增强胰岛素的分泌, 可能是 $PGF_{2\alpha}$ 增强了腺苷酸环化酶的活性, 胰岛 cAMP 升高所致^[4]。也有研究发现, 静脉给予 $PGF_{2\alpha}$ 对人体血糖和胰岛素水平均没有明显影响, 体外实验结果同样如此^[5]。早期相关的实验研究均是在胰岛水平进行, 假如 $PGF_{2\alpha}$ 有作用, 那么其靶点是在 α 细胞还是 β 细胞并不清楚, 而且当时也没有发现在糖尿病早期 $PGF_{2\alpha}$ 显著升高这个现象。

作者前期的实验已经证明, 一定范围内较高浓度的 $PGF_{2\alpha}$ 能够促进高浓度葡萄糖刺激下的 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌, 可能与细胞外钙内流增强有关, $PGF_{2\alpha}$ 升高可能是 β 细胞胰岛素分泌的一个有利调节因素^[6]。另一方面, β 细胞膜去极化在诱导胰岛素分泌中有非常重要的作用^[7]。 $PGF_{2\alpha}$ 增强葡萄糖刺激下的 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌是否与增强 β 细胞膜去极化有关? 其可能的机制是什么? 本文就此进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

$PGF_{2\alpha}$ 、钾通道阻断剂四乙胺 (tetraethylammonium chloride, TEA) 和氯通道阻断剂 4,4'-二异硫氰酸水合茛-2,2'-二磺酸 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS) 均购自 Sigma 公司。钾通道开放剂二氮嗪 (diazoxide)、DMEM 培养基和胰蛋白酶均为 Gibco BRL 公司产品。荧光指示剂 Fluo-

3/AM、非离子型多元醇表面活性剂 F-127 购自 Fluka 公司。胎牛血清购于杭州四季青公司。 [125 I] 胰岛素放射免疫分析药盒购于中国原子能科学研究院。其他实验试剂均为分析级。NIT-1 β 细胞为南方医科大学药物研究所吴曙光教授赠送。

1.2 细胞培养

将培养至对数生长期的 NIT-1 β 细胞用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA (体积比为 1:1) 消化成单细胞悬液, 按每孔大约 1×10^5 的密度接种于 96 孔平板, 每孔培养液体积为 200 μ L。于 95% 空气、5% CO₂ 和 37℃ 饱和湿度条件下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 48 h, 进行实验。

1.3 胰岛素含量测定

抽出 96 孔平板内培养液, 细胞用 KRBB 缓冲液^[8] (mmol·L⁻¹: NaCl 129, KCl 4.8, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 5, HEPES 10, 葡萄糖 0.1; 0.2% 牛血清白蛋白; NaHCO₃ 调至 pH 为 7.4) 预孵 30 min 后, 抽弃孵育液, 进行如下实验, 每孔终体积为 200 μ L, 所有实验液浓度均为终浓度, 每组实验设 6 个复孔。① 分别加入含 5.5 和 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的 KRBB 液, 10 min 后加入 5 μ mol·L⁻¹ 的 PGF_{2 α} 或 20 mmol·L⁻¹ 的 TEA, 观察 PGF_{2 α} 或 TEA 对葡萄糖刺激胰岛素释放的影响; ② 分别加入含 5.5 和 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的 KRBB 液, 10 min 后加入 5 μ mol·L⁻¹ 的 PGF_{2 α} , 继续孵育 20 min 后, 再加入 20 mmol·L⁻¹ 的 TEA, 观察 PGF_{2 α} 与 TEA 合用对胰岛素释放的影响; ③ 在 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖浓度下, 预先给予 60 mmol·L⁻¹ KCl + 250 μ mol·L⁻¹ 二氮嗪, 10 min 后加入 5 μ mol·L⁻¹ 的 PGF_{2 α} , 观察细胞膜处于最大去极化状态时 PGF_{2 α} 对胰岛素释放的影响; ④ 分别加入含 5.5 和 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的 KRBB 液, 同时加入 100 μ mol·L⁻¹ 的 DIDS, 10 min 后加入 5 μ mol·L⁻¹ 的 PGF_{2 α} , 观察氯通道阻断剂对 PGF_{2 α} 诱导胰岛素释放的影响。上述各组均继续孵育 70 min, 留取上清液, -20℃ 冻存, 待测胰岛素含量。胰岛素含量测定按胰岛素放射免疫分析药盒说明书方法进行。

1.4 细胞内钙离子浓度 ([Ca²⁺]_i) 测定

将培养皿内盖玻片上的细胞培养 48 h, 用 KRBB 液漂洗 2 次后, 加入荧光指示剂 Fluo-3/AM (终浓度为 5 μ mol·L⁻¹) 和非离子型的多元醇表面活性剂 F-127 (终浓度 0.25%, W/V), 避光孵育 30 min (37℃, 5% CO₂)。洗净染色液, 将盖玻片置于

激光共聚焦显微镜观察池中, 加 KRBB 液或无钙 KRBB 液 1 mL 进行实验。实验中根据需要, 扫描前及扫描过程中加入不同的工具药于 KRBB 液中。每种浓度至少测定 3 张盖玻片, 每张盖玻片至少分析 6 个细胞。采用波长 488 nm 的氩离子激光束为激发光, 530 nm 为发射光, 以 3 ~ 12 s 的速度间隔连续扫描, 总时间 5 ~ 10 min。计算机记录储存扫描结果。将荧光强度 (FI) 数据进行统计分析, 以 FI 与其基础对照值 (FI₀) 的比值 [(FI - FI₀)/FI₀] 表示 [Ca²⁺]_i 的变化, 得到细胞 [Ca²⁺]_i 变化的时间-效应曲线。

1.5 统计学分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 PGF_{2 α} 在 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖浓度下对胰岛素分泌的影响

在 16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖浓度下, 5 μ mol·L⁻¹ 的 PGF_{2 α} 或 20 mmol·L⁻¹ TEA 使 β 细胞胰岛素分泌明显增加 (表 1), 两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。然而, 先给予 TEA 再给 PGF_{2 α} 或先给予 PGF_{2 α} 再给 TEA, 胰岛素分泌与单独给予 TEA 或 PGF_{2 α} 的对照组比没有明显变化 ($P > 0.05$)。说明 PGF_{2 α} 的作用可能与 TEA 相似, 能够促进细胞膜去极化而增加胰岛素分泌。

Tab 1. Effects of tetraethylammonium chloride (TEA) and/or prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) on insulin release from NIT-1 β cells in the presence of 16.5 mmol·L⁻¹ glucose (Glu)

Group	Insulin secretion/mU·L ⁻¹
Glu	21.2 \pm 1.5
Glu + TEA	25.3 \pm 1.6 **
Glu + PGF _{2α}	27.0 \pm 1.9 **
Glu + TEA + PGF _{2α}	26.8 \pm 2.2 **
Glu + PGF _{2α} + TEA	27.0 \pm 2.3 **

Glu + TEA and Glu + PGF_{2 α} : After incubation with Glu for 10 min, TEA 20 mmol·L⁻¹ or PGF_{2 α} 5 μ mol·L⁻¹ was added. Glu + TEA + PGF_{2 α} and Glu + PGF_{2 α} + TEA: PGF_{2 α} 5 μ mol·L⁻¹ and TEA 20 mmol·L⁻¹ were successively added with a 20-min interval, respectively. When incubation for another 70 min, insulin content in supernatant was measured by radioimmunoassay. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with Glu alone.

2.2 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 在 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖浓度下对胰岛素分泌的影响

在 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖浓度下, 给予 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 或 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA 均不能促进 β 细胞胰岛素分泌 ($P > 0.05$)。但是先给予 TEA 再给 $\text{PGF}_{2\alpha}$, 胰岛素分泌与单独给予 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 或 TEA 的对照组相比明显增加 (表 2)。由此推断, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 可能在 TEA 诱发膜去极化的基础上进一步增强了这种去极化作用, 而促进低浓度葡萄糖刺激时的胰岛素分泌。

Tab 2. Effects of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and/or TEA on insulin release from NIT-1 β cells in the presence of $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose

Group	Insulin secretion/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
Glu	19.0 ± 1.3
Glu + $\text{PGF}_{2\alpha}$	20.5 ± 1.7
Glu + TEA	19.8 ± 1.9
Glu + TEA + $\text{PGF}_{2\alpha}$	$23.0 \pm 2.4^{**\#}$

See legend in Tab 1, but $\text{PGF}_{2\alpha}$ was added 10 min after TEA. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. $^{**} P < 0.01$, compared with Glu alone; $^{\#} P < 0.05$, compared with Glu + TEA.

2.3 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 在高钾 + 二氮嗪条件下对胰岛素分泌的影响

$16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖浓度下, 给予 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氮嗪使细胞膜处于最大去极化状态, 胰岛素分泌明显增加至 $(31.2 \pm 2.0) \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1), 此条件下再给予 $\text{PGF}_{2\alpha}$ $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不能进一步促进胰岛素的分泌 ($P > 0.05$)。说明在细胞膜处于最大去极化状态下, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 不能进一步增强膜去极化而诱导胰岛素分泌。

2.4 氯通道阻断剂对 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 诱导胰岛素分泌的影响

在 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖下, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DIDS 不抑制胰岛素的分泌 ($P > 0.05$), 而在 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖浓度下, 却明显抑制了葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (表 3)。16.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖浓度刺激下, 预先给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DIDS 再给 $\text{PGF}_{2\alpha}$, 胰岛素分泌不仅未增加, 反而较单用 DIDS 时进一步减少, 说明 DIDS 可以抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 诱导胰岛素分泌的作用。提示 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 诱导胰岛素分泌增加的作用可能与激活氯通道有关。

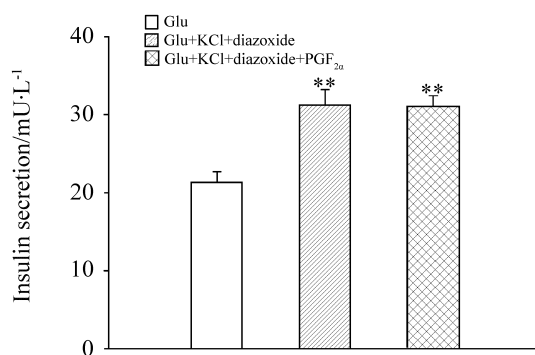


Fig 1. Effects of $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ on $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose-stimulated insulin secretion from NIT-1 β cells in the presence of $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ diazoxide. $\text{PGF}_{2\alpha}$ was added 10 min after KCl + diazoxide. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. $^{**} P < 0.01$, compared with Glu alone.

Tab 3. Effects of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DIDS and/or $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ on insulin release from NIT-1 β cells in the presence of 5.5 or $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose

Group	Insulin secretion/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
Glu 5.5	18.51 ± 1.12
Glu 5.5 + DIDS	18.28 ± 1.52
Glu 5.5 + DIDS + $\text{PGF}_{2\alpha}$	18.94 ± 1.74
Glu 16.5	$20.73 \pm 1.08^{**}$
Glu 16.5 + DIDS	$18.72 \pm 1.19^{\#}$
Glu 16.5 + DIDS + $\text{PGF}_{2\alpha}$	$16.91 \pm 1.09^{##}$

See legend in Tab 1. DIDS was added simultaneously with Glu. $\text{PGF}_{2\alpha}$ was added 10 min after 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. $^{**} P < 0.01$, compared with Glu $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $^{\#} P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$, compared with Glu $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.5 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

在 $16.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖作用下, 细胞内静息 FI 值为 51 ± 4 ($n = 6$), 给予 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 后, 可见细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高, FI 峰值为 85 ± 5 , 显著高于静息水平 ($P < 0.01$), 之后曲线逐渐下降进入新平台期 (图 2A)。

预先给予 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 和 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氮嗪后, 细胞内 FI 曲线迅速显著升高, 后稳定在新平台期, FI 值维持在 145 ± 14 ($n = 5$), 再给予 $\text{PGF}_{2\alpha}$, 不能使曲线进一步升高, FI 值 (147 ± 14) 没有显著变化 ($P > 0.05$), 说明细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 没有变化 (图 2B)。

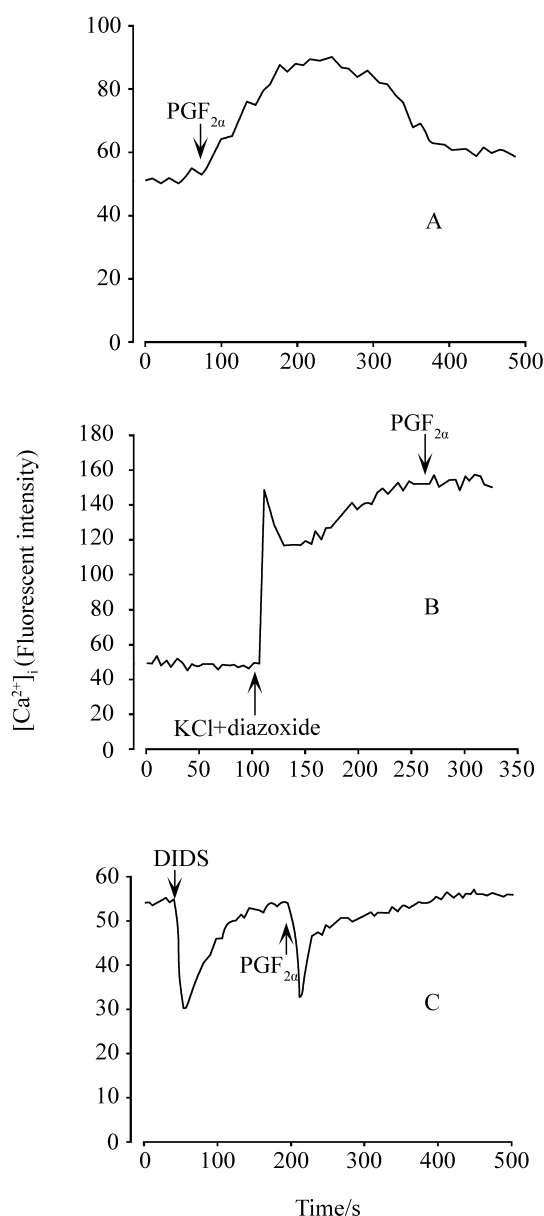


Fig 2. Effect of $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $PGF_{2\alpha}$ on $[Ca^{2+}]_i$ in NIT-1 β cells in the presence of $16.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose. A: the basal $[Ca^{2+}]_i$. B: $[Ca^{2+}]_i$ subsequent to $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl + $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ diazoxide. C: $[Ca^{2+}]_i$ subsequent to $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DIDS.

预先给予 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DIDS, 内钙动力曲线迅速下降后逐渐进入新的平台期, $[Ca^{2+}]_i$ 降低了 $(38 \pm 7)\%$ ($P < 0.01$), DIDS 显著抑制了高糖下的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高; 接着给予 $PGF_{2\alpha}$, 与新平台期相比, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 又一次下降了 $(25 \pm 13)\%$ ($P < 0.05$), 说明在 DIDS 作用下, $PGF_{2\alpha}$ 不能诱导细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 反而显著降低细胞 $[Ca^{2+}]_i$ (图 2C)。

3 讨论

众所周知, β 细胞膜去极化是诱导胰岛素分泌的一个重要因素^[7]。在小鼠 β 细胞, 钾通道阻断剂 TEA 在 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能够阻断 β 细胞膜上的 ATP 敏感钾通道 (K_{ATP})、钙激活钾通道 (K_{Ca}) 和延迟整流性钾通道, 可在 β 细胞胰岛素分泌机制研究中作为一种膜去极化试剂^[8,9]。本研究发现, 在 $16.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖刺激下, $PGF_{2\alpha}$ $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 TEA $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均能增强 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌; 然而先给予 $PGF_{2\alpha}$ 再给 TEA, 或先给予 TEA 再给 $PGF_{2\alpha}$, 均不能进一步升高胰岛素的分泌, 说明 $PGF_{2\alpha}$ 增强胰岛素分泌可能与 TEA 的作用机制相似, 即通过促进细胞膜去极化。其他证明还有, 在 $5.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖刺激下, $PGF_{2\alpha}$ 不能促进胰岛素分泌, 但先给予 TEA 再给 $PGF_{2\alpha}$, 胰岛素分泌明显增加, 说明 TEA 使 NIT-1 β 细胞膜去极化, $PGF_{2\alpha}$ 可能进一步增强了这种作用, 从而促进胰岛素分泌。

有研究显示^[10, 11], 在 KCl $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和钾通道开放剂二氮嗪 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用下, 葡萄糖刺激的 β 细胞处于最大去极化状态, 细胞外钙内流最强, $[Ca^{2+}]_i$ 升高达最大值。本实验预先给予相同浓度的 KCl 和二氮嗪, 使 NIT-1 β 细胞膜处于最大去极化状态, 可见 $PGF_{2\alpha}$ 不能进一步增强胰岛素分泌, 说明 $PGF_{2\alpha}$ 促进 NIT-1 β 细胞胰岛素分泌可能通过增强膜去极化的机制。细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 研究显示, 在 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 和 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氮嗪作用下, NIT-1 β 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高后稳定在较高值, 应用 $PGF_{2\alpha}$ 不能进一步升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 也显示了 $PGF_{2\alpha}$ 的作用可能是通过增强膜去极化升高细胞内钙, 同时也验证了先前高钾和二氮嗪共同作用使 β 细胞处于最大去极化状态和细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高达最大值的研究结论^[10, 11]。

在 β 细胞, 葡萄糖刺激引起膜去极化促进胰岛素分泌主要是由于关闭了 K_{ATP} 通道^[12]。最近研究发现, 使 β 细胞上的氯通道开放在增强膜去极化中也有重要作用^[13]。 β 细胞在高浓度葡萄糖刺激下, 可以激活容积调节性氯通道, 增强细胞膜去极化^[14]; 同时细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 激活钙激活的氯通道, 也可进一步引起 β 细胞去极化^[15]。

有文献报道, $PGF_{2\alpha}$ 也可以激活氯通道, 引起细胞去极化, 从而调节生物功能^[16]。在很多细胞, $PGF_{2\alpha}$ 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 可以激活钙激活氯通

道,胞内氯离子外流,引起细胞去极化,尽管 $[Ca^{2+}]_i$ 释放升高,PGF_{2α}也同时激活 K_{Ca}通道,使细胞复极化,但在多数情况下,激活钙激活的氯通道占主导地位,细胞表现为去极化而调节生物学功能^[16]。PGF_{2α}促进 NIT-1β 细胞膜去极化是否也通过激活氯通道途径? 本实验可见,氯通道阻断剂 DIDS 100 μmol·L⁻¹(许多 β 细胞研究证明此浓度的 DIDS 主要阻断容积调节性氯通道,而对其他非氯通道无明显影响^[17~19])显著抑制 16.5 mmol·L⁻¹葡萄糖浓度刺激下的 NIT-1β 细胞胰岛素分泌。说明在 NIT-1β 细胞,高浓度葡萄糖激活氯通道引起细胞去极化可能在增加胰岛素分泌中也发挥重要作用。而预先给予 DIDS 再给 PGF_{2α},胰岛素分泌甚至表现为抑制作用。可能的原因为,在 DIDS 作用下,β 细胞的氯通道被阻断,细胞由去极化状态转变为复极化状态,此时加入 PGF_{2α},PGF_{2α}激活的 K_{Ca}通道占主导作用,细胞进一步复极,胰岛素分泌反而被抑制。细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 研究也显示,在 DIDS 作用下细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速下降,恢复平台期后(这与国内外许多研究结论一致^[13,17~19])再应用 PGF_{2α}又会再引起 NIT-1β 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速下降。由于 β 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化与细胞膜动作电位变化密切相关,故也验证了作者上述的假设。总之,在氯通道阻断剂阻断 NIT-1β 细胞氯电流引起的膜去极化状态下,PGF_{2α}不能发挥其作用,说明 PGF_{2α}诱导膜去极化而发挥其生物学作用可能与激活 β 细胞氯通道有关。但仍需进一步证明,如通过膜片钳实验,记录 PGF_{2α}作用下氯电流的改变;应用分子生物学方法,如 RNA 干扰特异性的阻断相关类型氯通道,从而避免目前氯通道阻断剂特异性不够高的问题,将更具有说服力,这也是作者下一步实验的目标。

在不同类型细胞,PGF_{2α}增强细胞去极化的作用机制复杂。在 NIT-1β 细胞,尽管作者证明 PGF_{2α}能够增强膜去极化(可能通过激活氯通道),升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$,促进胰岛素分泌。但是 PGF_{2α}如何增强细胞去极化的机制仍需要进一步深入研究。当然,PGF_{2α}促进膜去极化可能并不是其诱导胰岛素分泌的唯一机制。

4 参考文献:

- [1] Peredo HA, Feleder EC, Adler-Graschinsky E. Time-course of the alterations in prostanoid production and in contractile responses of mesenteric beds isolated from streptozotocin diabetic rats [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999, **60**(4):269–274.
- [2] Landgraf R, Landgraf-Leurs MM. The prostaglandins system and insulin release. Studies with the isolated perfused rat pancreas [J]. *Prostaglandins*, 1979, **17**(4):599–613.
- [3] Moran M. Prostaglandins and the release of insulin. A review and a proposal [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1988, **32**(2):95–99.
- [4] Giugliano D, Torella R, Scheen AJ, Lefebvre PJ, D'Onofrio F. Prostaglandins, insulin secretion and diabetes mellitus [J]. *Diabet Metab*, 1988, **14**(6):721–727.
- [5] Spellacy WN, Buhi WC, Holsinger KK. The effect of prostaglandin F₂ and E₂ on blood glucose and plasma insulin levels during pregnancy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1971, **111**(2):239–243.
- [6] Ye CL, Yuan ZY, Shen B, Liu JJ, Lu ZX, Zhong L. Effects of prostaglandin F_{2α} on the glucose-stimulated insulin secretion in NIT-1β cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, in press.
- [7] Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW. Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion [J]. *Diabetes*, 1999, **48**(9):1686–1690.
- [8] Fatherazi S, Cook DL. Specificity of tetraethylammonium and quinine for three K channels in insulin-secreting cells [J]. *J Membr Biol*, 1991, **120**(2):105–114.
- [9] Bokvist K, Rorsman P, Smith PA. Block of ATP-regulated and Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse pancreatic beta-cells by external tetraethylammonium and quinine [J]. *J Physiol*, 1990, **423**:327–342.
- [10] Thams P, Capito K. Differential mechanisms of glucose and palmitate in augmentation of insulin secretion in mouse pancreatic islets [J]. *Diabetologia*, 2001, **44**(6):738–746.
- [11] Thams P, Capito K. L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide [J]. *Eur J Endocrinol*, 1999, **140**(1):87–93.
- [12] Henquin JC. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues [J]. *Diabetes*, 2004, **53**(Suppl 3):S48–S58.
- [13] Best L, Brown PD, Sheader EA, Yates AP. Selective inhibition of glucose-stimulated beta-cell activity by an anion channel inhibitor [J]. *J Membr Biol*, 2000, **177**

[1] Peredo HA, Feleder EC, Adler-Graschinsky E. Time-course of the alterations in prostanoid production and in

- (2):169-175.
- [14] Best L. Evidence that glucose-induced electrical activity in rat pancreatic beta-cells does not require K_{ATP} channel inhibition[J]. *J Membr Biol*, 2002, **185**(3):193-200.
- [15] Kozak JA, Logothetis DE. A calcium-dependent chloride current in insulin-secreting beta TC-3 cells [J]. *Pflugers Arch*, 1997, **433**(6):679-690.
- [16] Jiang J, Backx PH, Teoh H, Ward ME. Role of Cl^- currents in rat aortic smooth muscle activation by prostaglandin F_2 alpha [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, **481**(2-3):133-140.
- [17] Best L. Study of a glucose-activated anion-selective channel in rat pancreatic beta-cells[J]. *Pflugers Arch*, 2002, **445**(1):97-104.
- [18] Sheader EA, Brown PD, Best L. Swelling-induced changes in cytosolic $[Ca^{2+}]$ in insulin-secreting cells: a role in regulatory volume decrease[J]? *Mol Cell Endocrinol*, 2001, **181**(1-2):179-187.
- [19] Best L, Speake T, Brown P. Functional characterisation of the volume-sensitive anion channel in rat pancreatic beta-cells[J]. *Exp Physiol*, 2001, **86**(2):145-150.

Potentiative effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and elevation of intracellular calcium in NIT-1 β cells

YE Chun-Ling^{1*}, YUAN Zhen-Yu¹, REN Sheng-Hua¹, YE Tao², ZHONG Ling¹, JIANG Jia-Hua³
(1. Department of Pharmacology, Pharmacy College, 2. Huaqiao Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Physiology, Medical Science Building, Toronto University, Toronto, Canada)

Abstract: **AIM** To explore the cellular mechanisms in which prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) augments glucose stimulated insulin secretion in NIT-1 β cells. **METHODS** Insulin content in supernatant was measured by radioimmunoassay. Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of NIT-1 β cells was determined by confocal laser scanning method with Fluo-3/AM as a fluorescent probe. **RESULTS** In the presence of 16.5 mmol \cdot L⁻¹ glucose, 5 μ mol \cdot L⁻¹ $PGF_{2\alpha}$ or 20 mmol \cdot L⁻¹ tetraethylammonium (TEA, a potassium channel blocker) both increased significantly insulin secretion, while combination of TEA and $PGF_{2\alpha}$ could not induce more elevation in insulin secretion. In the presence of 5.5 mmol \cdot L⁻¹ glucose, $PGF_{2\alpha}$ did not increase insulin secretion. But when pretreated with TEA, $PGF_{2\alpha}$ significantly enhanced insulin secretion stimulated by 5.5 mmol \cdot L⁻¹ glucose. $PGF_{2\alpha}$ did not potentiate insulin secretion stimulated by 16.5 mmol \cdot L⁻¹ glucose when NIT-1 β cells were in depolarized condition in the presence of 60 mmol \cdot L⁻¹ KCl and 250

μ mol \cdot L⁻¹ diazoxide or pretreated with chloride channel blocker 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). Otherwise, $PGF_{2\alpha}$ significantly elevated NIT-1 β cells $[Ca^{2+}]_i$, but pretreated with 60 mmol \cdot L⁻¹ KCl and 250 μ mol \cdot L⁻¹ diazoxide, the effect was canceled. DIDS not only decreased significantly $[Ca^{2+}]_i$ of NIT-1 β cells, but also reversed the effect of $PGF_{2\alpha}$ from increasing $[Ca^{2+}]_i$ to decreasing $[Ca^{2+}]_i$. **CONCLUSION** Potentiation of $PGF_{2\alpha}$ on the glucose-induced insulin secretion may be mediated by membrane depolarization through activation of chloride channels and elevation of $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: prostaglandin $F_{2\alpha}$; insulin; cells, NIT-1 β ; calcium, cytosolic; chloride channels

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (04010463); and by National Natural Science Foundation of China (30070873)

* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)