胰岛β-细胞膜色谱模型建立及其生物亲合特性

杨广德 贺浪冲* 边晓丽 赵 良

(西安交通大学医学院药学系, 西安 710061. * 联系人, E-mail: helc@mail.xjtu.edu.cn)

摘要 建立胰岛β-细胞膜色谱模型, 以硅胶为载体, 将兔胰腺β-细胞膜固定在其表面制备成胰岛β-细胞膜固定相. 用lowry法测定膜蛋白含量, 用电子显微镜和表面能谱分析技术, 对固定相表面特性进行分析, 并测定其K^+, Na^+-ATP酶活性. 胰岛β-细胞膜色谱柱(10 mm × 2 mm, I.D.)在(37 ± 0.5)℃条件下, 以25 mmol·L^{-1}硫酸铵缓冲液(pH 7.4)为流动相, 流速为0.2 mL·min^{-1}, 在不同检测波长分析了4种磺酰脲类降血糖药物格列喹酮、格列本脲、格列吡嗪和格列奇特的保留特性, 用药物容量因子的对数值($\log k'$)表示其亲合作用强度. 并与药物对小鼠正常血糖的活性强度进行了相关性分析比较.

关键词 胰岛β-细胞膜 细胞膜色谱 磺酰脲类药物 降糖活性

II 型或非胰岛素依赖型糖尿病(type II or no-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)是由于胰岛素分泌功能缺损和胰岛素抵抗等多种因素引起的一种全身性的糖、脂、蛋白质代谢紊乱疾病, 临床上以血糖升高为其特点, 并发症可引起多脏器、多系统损害[1~3]. 其中, 胰岛素分泌功能的降低是NIDDM发生和发展的主要因素之一. 细胞生理学研究表明, 在胰岛β-细胞膜上表达有磺酰脲受体(sulfonylurea receptor, SUR), 磺酰脲类(sulfonylureas, SUs)药物通过作用于胰岛β-细胞膜上的SUR, 诱导ATP-依赖型K^+通道的关闭, 刺激胰岛β-细胞释放胰岛素[4~10], 而发挥降糖作用[11,12]. 因此, SUs药物成为临床上治疗NIDDM的主要药物[13]. 同时, 以胰岛β-细胞膜上的磺酰脲受体为筛选靶点, 也成为发现胰岛素释放剂的重要手段之一[14,15], 实验方法有钾离子流直接测定法[16]、药物的放射性标记法[17,18]等.

本文利用细胞膜色谱[19~21](cell membrane chromatography, CMC)技术, 建立胰岛β-细胞膜色谱模型, 以SUs药物为模型药物, 对其色谱亲合特性和药理作用的相关性进行了系统研究. 实验结果表明胰岛β-细胞膜色谱模型对SUs药物具有特异性的亲合作用, 其亲合作用强度与模型药物的降糖作用强度密切相关, 可用于降糖活性化合物的筛选和研究.

1 实验

1.1 材料与试药

色谱分析系统包括 SPECTRA SERIE P200 色谱泵和 SPECTRA 100 紫外检测器(Thermo Separation Products, 美国), 7125 型手动进样阀(Rheodyne 公司, 美国)和 ANASTAR 色谱工作站(奥泰科技有限公司, 天津); HERMLE ZK-401 型低温冷冻高速离心机(德国); Philips XL series. XL20 型扫描电子显微镜; EDAX DX-4 能谱仪(荷兰);

标准品格列本脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列齐特(Sigma 公司, 美国).

试验用药品格列本脲(天津力生制药股份有限公司), 格列吡嗪(意大利法玛西亚普强公司), 格列喹酮(德国勃林格殷格翰国际公司, 批号 020306)和格列齐特(法国施维雅药厂), 葡萄糖氧化酶试剂盒、^{125}I-胰岛素试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司).

健康家兔, 雌雄不限, 体重 2.0~2.5 kg, 昆明种雄性小白鼠, 体重 18~22 g, 均由西安交通大学医学实验动物中心提供. 大孔球形硅胶(粒度 3~5 μm, 孔径 100 Å), 中国科学院化学研究所提供.

1.2 胰岛β-细胞膜的制备

参考文献方法[22], 将家兔剪断颈动脉处死, 剖腹取胰腺, 收集于PBS液中, 去尽结缔组织、血管和脂肪, 除尽凝血和其他杂质. 剪碎, 用PBS搅拌, 静置, 使组织沉降, 弃上清液. 加入预热 37℃的胶原酶液 10 mL, 搅拌 5~6 min, 使胰腺细胞分散. 静置 2 min, 取出含细胞的上清液, 置预冷 4℃的含 1 mL胎牛血清的离心管中. 余下的组织块, 再加胶原酶 10 mL, 继续消化. 如此重复 4~5 次, 使胰腺细胞充分酶解分散, 得胰岛粗细胞.

将胰岛粗细胞, 倒入离心管中, 冷冻离心. 先以 400 r·min^{-1}, 4℃离心 10 min, 弃去沉淀, 取上清液. 将悬浮液沿离心管壁小心注入Ficoll 400 梯度分离层的上层. 离心(3000 r·min^{-1}, 10 min). 可见 4 个清晰

的界面层. 小心取出第 2 层, 再以 8000 r • min^{-1}, 4 ℃离心 10 min, 倾去上清液, 往沉淀中加入适量的生理盐水, 振荡, 同样条件离心洗涤一次, 弃去上清液, 得沉淀胰岛细胞[23]. 取胰岛细胞液, 用 0.5 mg • mL^{-1} type 溶液处理后[24], 在显微镜下观察并进行目测, 其中胰岛β-细胞应占 75%以上. 往沉淀胰岛细胞中加入低渗液适量, 超声 20 min, 在 8000 r • min^{-1}, 4℃的条件下离心 10 min, 即得胰岛β-细胞膜. 测定胰岛β-细胞膜的K^+、Na^+-ATP酶活性, 用lowry法测定膜蛋白含量为 3.35 mg • mL^{-1}. –34℃保存备用.

1.3 硅胶预处理

在 250 mL烧杯中加入 5.0 g大孔球形硅胶, 混悬于 1.0 mo1 · L^{-1}盐酸溶液 100 mL, 超声处理 15 min, 然后将其转移至 250 mL三颈瓶中, 在搅拌下回流 2 h. 反应完毕后将混悬液转移至 1000 mL烧杯中, 加 800 mL蒸馏水并搅拌使其呈混悬状, 静置, 倾去上清液, 重复此操作 4 次. 最后用G4 玻璃坩锅抽干, 于 120℃活化 7 h, 作为制备细胞膜定相的载体备用.

1.4 胰岛细胞膜固定相制备

取经活化处理的硅胶 0.3 g, 作为细胞膜的载体置于低温反应管中, 在抽真空和震荡条件下, 分别加入胰岛细胞膜悬液适量(一般膜蛋白浓度不低于 2.12 mg · mL^{-1}), 进行 1 h的反应后, 加入适量生理盐水水溶液, 在 25℃条件下, 使磷脂双层进行自身相互作用, 直至在载体表面形成均匀的细胞膜. 低速离心除去上清液, 载体细胞膜用Tris-HCL缓冲溶液洗涤, 除去未结合的细胞膜.

1.5 色谱条件

以载体细胞膜作为细胞膜色谱法的固定相, 用低压湿法装入色谱柱(10 mm × 2 mm, I.D.)中. 流速: 0.2 mL · min^{-1}, 检测波长: 格列本脲 229 nm、格列吡嗪 225 nm、格列奇特 228 nm、格列喹酮 223 nm, 柱温: 37℃, 用 25 mmo1 ·L^{-1}硫酸铵缓冲液(pH 7.4)为流动相平衡 3~4 h后, 开始进样分析.

2 结果与讨论

2.1 胰岛细胞膜固定相表面特征

在上述实验条件下, 胰岛β-细胞膜将不可逆地吸附于载体硅胶表面, 并在适当温度下, 使胰岛细胞膜碎片自身相互融合, 形成完全覆盖的细胞膜固定相. 经电子显微镜技术和表面能谱技术对胰岛β-CMSP 表面进行了测试. 图 1(a)和图 1(b)分别为用

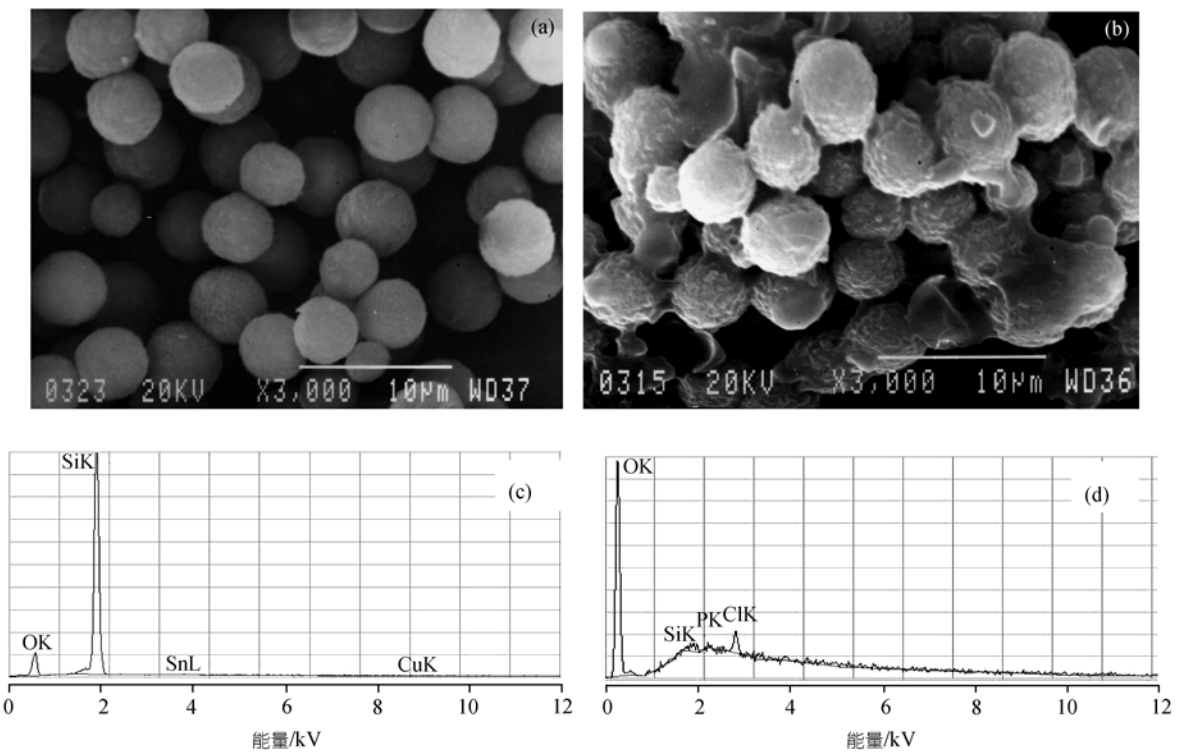


图 1 纯硅胶载体和胰岛β-CMSP 的扫描电子显微镜图像及电子能谱表面分析图

(a) 纯硅胶载体(放大 3000 倍); (b) 胰岛β-CMSP(放大 3000 倍); (c) 纯硅胶载体电子能谱表面图; (d) 胰岛 β-CMSP 电子能谱表面图

电子显微镜放大 3000 倍后观察到纯硅胶载体与胰岛β-CMSP 的扫描电子显微镜图像. 由图 1 可见, 与纯硅胶载体不同, 胰岛β-CMSP 表面已完全被胰岛细胞膜所覆盖.

对纯硅胶载体与胰岛 β-CMSP 分别进行能谱分析, 从图 1(c)的能谱图看出, 有氧(O)的能谱峰, 有较强的硅(Si)能谱峰; 从图 1(d)能谱图看出, 增加了碳(C)的能谱峰, 而硅(Si)峰几乎消失. 这进一步证实了在上述条件下制备的胰岛β-CMSP, 其表面完全被细胞膜所覆盖, 胰岛β-CMSP 将表现出细胞膜的特性.

2.2　胰岛 CMSP 的酶活性

载体硅胶与胰岛细胞膜结合所制备的胰岛β-CMSP, 将具备一般膜制剂的性质, 而保持其酶活性. 实验中, 将制备好的胰岛细胞膜悬浮于一定体积的Tris缓冲液中, 用Lowry法测膜蛋白后, 等体积分成 3 份, 第 1 份作为悬液细胞膜, 第 2 份离心后得沉淀细胞膜, 第 3 份制备成细胞膜固定相(CMSP). 分别考查在–28, –10, 4 及 25℃的条件下, 放置 0, 12, 36, 60, 80 和 108 h后, 其K^+、Na^+-ATP酶活性的变化趋势, 如图 2 所示. 同时, 对 3 种不同赋存状态细胞膜的酶活性, 在不同温度下随时间变化趋势进行计算, 求出其稳定性参数$t_{0.9}$值(注: $t_{0.9}$表示酶活性下降 10%所需要的时间), 结果见图 3.

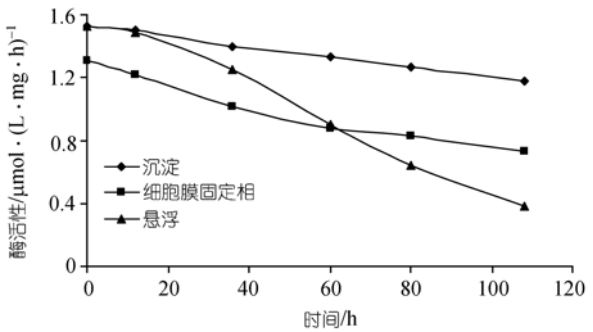


图 2　3 种不同状态的胰岛β-细胞膜在–28℃贮存时酶活性随时间的变化规律

结果表明胰岛β-CMSP 与其他两种细胞膜制剂(悬液细胞膜和沉淀细胞膜)类似, 具有酶活性特征, 并在较宽的温度和一定的时间范围内保持稳定.

2.3　色谱特性

以胰岛β-CMSP 为填料制备成色谱柱, 在保持其酶活性的同时将具有特殊的亲合色谱特性, 能够选

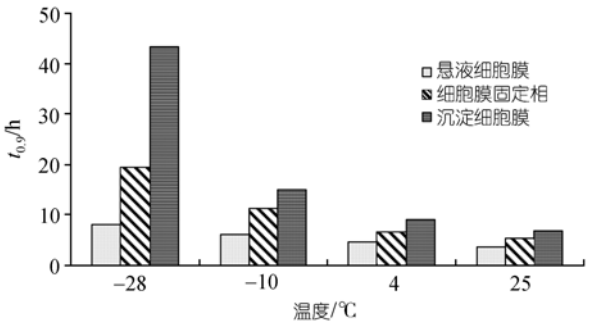


图 3　3 种不同赋存状态胰岛β-细胞膜的有效期

择性地识别与胰岛细胞膜作用的药物分子或成分. 同其他色谱方法相同, 其作用强度可以用溶质容量因子的对数值($\log k'$)来表示, 即

$$\log k' = \log[(t_R - t_0)/t_0],$$

其中, t_R 为溶质的保留时间, t_0为不保留的溶剂流出时间, 或为非磺酰脲类药物的流出时间, 以扣除非特异性作用引起的保留. 在 37℃, 以硫酸铵缓冲溶液为流动相条件下, 比较了胰岛β-CMC模型(β-CMSP)与正相(纯硅胶固定相)和反相(C_{18}固定相)色谱特性, 测试了相同药物分子在 3 种色谱系统中的$\log k'$值, 结果表明(表 1): (1) 在正相色谱系统中, 4 种药物分子几乎不保留, $\log k'$值很小, 且无明显差异. 表明 4 种药物分子的极性较弱, 与硅胶固定相几乎无作用; (2) 在反相色谱系统中, 单用硫酸盐缓冲液为流动相不能将 4 种药物分子洗脱下来, 而改用硫酸铵缓冲液/甲醇(60∶40)为流动相时, 其保留时间各异, $\log k'$值差异明显. 但是, 这种差异只能反映药物分子的亲脂性(主要为疏水作用力), 与其药效作用的相关性较差; (3) 在胰岛β-CMC系统中, 4 种药物分子的保留时间亦各不同, $\log k'$值差异同样明显, 其差异性充分显示了药物分子与胰岛β-细胞膜及膜蛋白的相互作用特性, 作用强度($\log k'$值)在很大程度上可直接反映药物分子的内在活性, 并与药效作用显著相关.

表 1　4 种降糖药物在不同固定相上的色谱保留特性

药物	色谱保留特性($\log k'$)		
	纯硅胶固定相	胰岛细胞膜固定相	C_{18}固定相
格列喹酮	–0.15	1.62	1.28
格列本脲	–0.52	1.27	1.47
格列吡嗪	–0.30	0.95	1.02
格列奇特	–0.69	0.60	1.72

所以, 相同药物分子在 3 种色谱系统中有着完全不同的色谱保留行为, 而只有在胰岛β-CMC 系统中

的色谱保留特性(如 logk' 值)可以直接表征其特异性和生物作用活性. 由于胰岛β-CMC 模型是建立在分子与特定胰岛β-细胞膜及磺酰脲受体间特异性相互作用力基础上, 当细胞膜色谱柱保持一定酶活性时, 在上述色谱条件下, 磺酰脲类药物的保留特性主要反映的是特异性的亲合相互作用, 而磺酰脲类药物在胰岛β-CMC 系统中的非特异性作用则通过溶剂空白扣除.

2.4 胰岛β-CMC 系统的稳定性

胰岛β-CMSP的形成是由于硅胶硅羟基对细胞膜的吸附作用以及细胞膜自身的融合等作用. 实验过程中, 为了考察胰岛β-CMSP上细胞膜是否会稳定, 而不流失. 将使用一周后的填充胰岛β-CMSP的色谱柱取下, 打出柱内的全部填料, 按柱前、柱后顺序等重量分为两份, 用Lowry法分别测定两份样品中膜蛋白的含量, 连续测定 9 根色谱柱, 经t检验, 柱前膜蛋白量为(17.21 ± 3.14) mg • g^{-1}、柱后膜蛋白量为(18.03 ± 2.78) mg • g^{-1}, 柱前后膜蛋白含量没有显著性差异. 实验结果表明: 经使用过程中流动相的冲刷, 胰岛β-CMSP上的细胞膜仍均匀分布, 几乎没有脱落而被冲到柱子的另一端.

所以, 用本文方法制备的胰岛 β-CMSP 柱在使用过程中, 其上的细胞膜稳定, 不易流失. 另外, 考虑到胰岛β-CMSP 是一种具有酶活性的生物色谱填料, 其酶活性随时间增加而降低, 在目前条件下, 胰岛β-CMSP 柱的使用寿命大约为 3 d.

2.5 与药理实验结果的相关性

小鼠 63 只, 按体重分层分为 5 组, 依次是阴性对照组、格列本脲、格列吡嗪、格列喹酮和格列齐特. 在实验环境下饲养 3 d, 眼眶取血, 离心, 取血清 10 μL, 葡萄糖氧化酶法测定血糖, 记为药前血糖值. ig 给予对应药物, 每日一次, 连续 7 d, 末次给药 2 h 后, 眼眶取血, 再次测定血糖, 记为药后血糖值, 血糖测定前均需禁食(不禁水)10 h. 另外, 取血清 100 μL 用作血清胰岛素水平的测定. 实验结果采用 t 检验统计分析. 结果见表 2.

从表 2 中数据可以得出, 磺酰脲类药物降低小鼠正常血糖药理作用强度顺序依次为: 格列喹酮 > 格列本脲 > 格列齐特 > 格列吡嗪, 此顺序与其在胰岛β-CMC 系统中的保留参数 logk' 值的大小趋势一致, 二者的相关系数为 0.9206, 见图 4. 同时, 与血清胰岛素水平的高低也存在正相关性, 二者的相关系数为 0.8636. 与药效结果的显著相关性表明, 本文建立的胰岛β-细胞膜色谱模型, 尽管其中存在少量α-细胞膜, 但由于其上不含有磺酰脲受体, 所以模型测定的亲合性(logk')大小反映的是磺酰脲类药物与胰岛 β-细胞膜及磺酰脲受体的特异性相互作用.

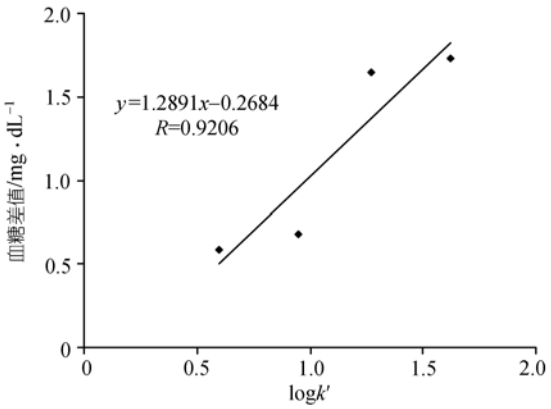


图 4 logk'与血糖差值的相关性比较

3 结论

由胰岛细胞中主要为β-细胞制备的胰岛β-CMC 色谱系统, 是一种仿生学的亲合色谱系统, 可以在体外定量表征降糖类药物分子在体内与胰岛细胞膜及膜受体的相互作用特性. 药物分子与固定相亲合作用强度参数(logk'值)与其药效作用显著相关; 胰岛β-CMSP 与其他胰岛细胞膜制剂类似, 在一定的时间范围内具有同样的生物活性; 由胰岛β-CMSP 构成的色谱系统, 与传统的正相和反相色谱系统不同, 具有

表 2 4 种磺酰脲类药物对小鼠正常血糖和血清胰岛素水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g · kg^{-1}	例数	血糖值/mg · dL^{-1}			血清胰岛素水平/μu · mL^{-1}
			药前	药后	差值(前-后)	
阴性对照	–	14	6.41 ± 0.75	6.38 ± 1.31	0.04 ± 1.11	25.7 ± 10.3
格列喹酮	0.0128	12	6.42 ± 1.32	4.69 ± 1.00	1.73 ± 1.21[a)]	28.4 ± 13.6
格列本脲	0.0288	13	6.24 ± 0.82	4.85 ± 1.31	1.65 ± 1.22[a)]	28.2 ± 12.3
格列吡嗪	0.0288	12	6.50 ± 0.54	5.82 ± 15.4	0.68 ± 1.59[b)]	27.6 ± 9.0
格列齐特	0.464	12	6.75 ± 1.02	6.16 ± 1.49	0.59 ± 1.84	24.1 ± 13.5

与阴性对照比较: a) $P<0.01$; b) $P<0.05$

色谱分离与活性识别的“双重”特性; 胰岛β-CMC 色谱模型在有效时间内, 具有相对的稳定性, 可以用于以磺酰脲受体为靶标的药物作用特性比较研究和先导化合物筛选研究.

致谢 本工作为陕西省自然科学基金资助项目(批准号: 2003C205, 2002G231).

参 考 文 献

1 Wang H, Craig R L, Schay J, et al. α-Endosulfine, a positional and functional candidate gene for type 2 diabetes: molecular screening, association studies, and role in reduced insulin secretion. Molecular Genetics and Metabolism, 2004, 81(1): 9~15[DOI]

2 Ward W K, Beard J C, Halter J B, et al. Pathophysiology of insulin secretion in non- insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Care, 1984, 7: 491~502

3 Kahn S E, Porte D J. The pathophysiology of type Ⅱ (noninsulin- dependent) diabetes mellitus: implications for treatment. Diabetes Mellitus, 1996, 45: 487~512

4 Ashcroft F M, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreas β-cells . Prog Biophys Mol Bio, 1991, 54: 87~143

5 Edwards G, Weston A H. The pharmacology of ATP- sensitive potassium channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993, 33: 597~637[DOI]

6 Katja H, Uwe P. Inhibition of ATP-sensitive K^+-channels by a sulfonylurea analogue with a phosphate group. Biochemical Pharmacology, 2003, 65(4): 599~602

7 Ashcroft F M, Ashcroft S J H. The sulphonylurea receptor. Biochim Biophys Acta, 1992, 1175: 45~59[DOI]

8 Ashcroft F M, Gribble F M. ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. Diabetologia, 1999, 42: 903~919[DOI]

9 Ashcroft F M, Harrison D E, Ashcroft S J H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic b-cells. Nature, 1984, 312: 446~448[DOI]

10 Ashcroft F M, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic β-cell. Prog Biophys Mol Bio, 1989, 54: 87~143[DOI]

11 Mikhailov M V, Mikhailova E A, Stephen J H. Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β-cell K_{ATP} channel. FEBS Lett, 2001, 499(1-2): 154~160[DOI]

12 Steven E K. The importance of the β-Cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The American J of medicine, 2000, 108(17): 2~8

13 Kazumitsu U, Michinori, Kouichi T. et al. Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. Biochim Biophys Acta, 1999, 1461(2): 305~313

14 Park E J, Bae J H, Kim S Y. et al. Inhibition of ATP-sensitive K^+ channels by taurine through a benzamido-binding site on sulfonylurea receptor 1. Biochem Pharmacol, 2004, 67(6): 1089~1096[DOI]

15 Mikhaiova E A, Stephen J H. A novel simple method for the investigation of drug binding to the K_{ATP} channel sulfonylurea receptor. Anal Biochem, 2002, 307(2): 383~385[DOI]

16 Ashcroft F M, Gribble F M. Tissue-specific effects of sulfonylureas: Lessons from studies of cloned K_{ATP} channels. J of Diabetes and its Complications, 2000, 14(4): 192~196[DOI]

17 Mikhailov M V, Mikhailova E A, Stephen J H. Investigation of the molecular assembly of β-cell K_{ATP} channels. FEBS Lett, 2000; 482(1-2): 59~64[DOI]

18 Tanabe K, Tucker S J, Ashcroft F M. et al. Direct Photoaffinity Labeling of Kir6.2 by [γ-^{32}P]ATP-[γ]4-Azidoanilide. Biochem Biophy Res Com, 2000, 272(2): 316~319[DOI]

19 贺浪冲, 耿信笃. 细胞膜受体色谱法——研究药物与受体作用的新方法. 生物医药色谱新进展, 1996, 3: 8~9

20 贺浪冲, 杨广德, 耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶活性及其色谱特性. 科学通报, 1999, 44(6): 632~636

21 He L C, Wang S C, Geng X D. Coating and fusing cell membrane onto a silica surface and their chromatographic characteristics. Chromatographia, 2001, 54: 71~76

22 张均田主编. 现代药理实验方法(上册). 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 999~1015

23 张桦, 蔡德鸿, 徐春生, 等. 一种简易高效的大鼠胰岛分离纯化方法. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 129~131

24 Hu S L, Wang S Y. Effect of insulinotropic agent nateglinide on Kv and Ca^{2+} channels in pancreatic β-cell. Euro J Pharmacol, 2001, 427: 97~104[DOI]

(2005-01-31 收稿, 2005-04-06 收修改稿)