

高浓度胰岛素抑制人白血病细胞株 K562 增殖的实验研究

庄伟煌¹, 黄茂娟^{2△}, 潘敬新¹

1. 福建医科大学附属第二医院 血液内科(泉州 362000); 2. 福建医科大学附属第二医院 检验科(泉州 362000)

【摘要】 目的 探讨高浓度胰岛素(insulin,INS)对 K562 细胞株增殖的抑制作用及其机理。方法 用不同浓度胰岛素处理 K562 细胞,分别用 CCK-8 法、细胞计数法和台盼蓝拒染法检测 K562 细胞的增殖活性,同时检测培养基中葡萄糖浓度变化;流式细胞术检测 K562 细胞的凋亡效应;并分别采用不同浓度的胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和 IGF-1 受体非特异性阻滞剂苏拉明(Suramin)对高浓度胰岛素影响 K562 细胞增殖作用进行干预。结果 胰岛素在 0.1~1 mU/mL 浓度下具有明显促进 K562 细胞增殖的作用,而高浓度胰岛素(1.6~100 mU/mL)则相反;无论培养基中葡萄糖浓度高低,高浓度胰岛素都有对 K562 细胞增殖的抑制作用;高浓度胰岛素抑制 K562 细胞增殖呈时效和量效关系;0.1、1、10、100 mU/mL 胰岛素处理 K562 细胞 48 h,与对照组比较,0.1、1 mU/mL 浓度下抑制细胞凋亡,而 10、100 mU/mL 浓度下促进细胞凋亡(P 均 <0.05);IGF-1 能逆转高浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的抑制作用,并且具有量效和时效关系;Suramin 能增强高浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的抑制作用,并且具有量效和时效关系。结论 胰岛素对 K562 细胞有双重作用,即在 0.1~1 U/mL 浓度下促进细胞增殖、抑制凋亡,高浓度(1.6~100 mU/mL)下抑制细胞增殖、促进凋亡,且其抑制作用与培养基中葡萄糖代谢无关与抑制 IGF-1 途径有关。

【关键词】 胰岛素 白血病细胞 抑制增殖 高浓度 IGF-1

Inhibitory Effect of High Concentration Insulin on the Proliferation of Human Leukemia Cell Strain K562 ZHUANG Wei-huang¹, HUANG Mao-juan^{2△}, PAN Jing-xin¹. 1. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

△ Corresponding author, E-mail: 754878024@qq.com

【Abstract】 **Objective** To study the impact of high concentration insulin on the proliferation and apoptosis of K562 cell strain. **Methods** K562 cells were treated with different concentrations of insulin. The proliferation activity was tested by CCK-8 assay, cytometry, and trypan blue exclusion. The alterations in glucose concentration of the culture media were monitored while the apoptosis of K562 cells was detected by flow cytometry. The effects of high concentration insulin on the proliferation of K562 cells were inhibited by varying concentrations of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and Suramin. **Results** Under the range of concentration (0.1-1 mU/mL), insulin facilitated the proliferation of K562 cells. In contrast, insulin at high concentrations (1.6-100 mU/mL) had the opposite effect, in a dose- and time-dependent manner. Different concentrations of glucose in the culture medium had no significant influence on the inhibitory effect of high concentration insulin on the proliferation of human leukemia cell strain K562. At low concentration insulin inhibited the apoptosis of K562 cells, in a dose-dependent manner. In contrast, insulin at high concentration had the opposite effect, in a dose-dependent manner. Furthermore, IGF-1 reversed the inhibitory effect of high concentration insulin on the proliferation of K562 cell in a dose- and time-dependent manner. Suramin, which is an IGF-1 receptor non-specific blocker, had the opposite effect on K562 cells, also in a dose- and time-dependent manner. **Conclusion** These results indicate insulin has a dual effect on K562 cells. The dual effect is probably mediated by the binding of insulin and IGF-1R. Inhibitory effect of high concentration insulin on the proliferation of K562 cells is unrelated with the glucose metabolism in the culture media.

【Key words】 Insulin Leukemia cell Inhibitory effect of proliferation High concentration Insulin-like growth factor-1

近年以来,大量的研究发现,在肥胖或胰岛素(insulin,INS)抵抗的糖尿病患者中肿瘤的发病率

显著增高(比正常高 3.5~5.0 倍)^[1-2]。胰岛素除了经典的代谢调节作用外,还有促进细胞增殖、分化和抑制凋亡的作用^[3]。胰岛素生物学效应通过与其受体结合后、产生信号转导而实现。在胰岛素激发

信号传递中,主要有两条通路:Ras/MAPK 途径和 PI3K/Akt 途径^[4]。Ras/MAPK 信号转导通路一直被认为是在肿瘤的进展和抗肿瘤治疗的过程中起主要作用的途径^[5]。胰岛素样生长因子(IGF)是胚胎和动物出生后生长的主要决定因素。IGF 有两类,即 IGF-1 和 IGF-2。IGF 通过与胰岛素样生长因子受体(IGFR)结合,进而激活了 Ras/MAPK 和 PI3K/Akt 两条细胞内信号传导通路,促进细胞的有丝分裂和分化。IGF-1 和 IGF-2 都能刺激 DNA 合成和细胞复制,从而促进细胞的增殖和分化。IGF 还可抑制细胞凋亡。因此,IGF 具有明显促肿瘤的发生和发展作用。

本课题组在胰岛素相关的实验研究中,发现高浓度胰岛素对 K562 细胞的增殖具有显著抑制作用^[6]。目前,胰岛素体外促肿瘤生长作用的国内外研究主要集中在多种实体瘤细胞株如乳腺癌细胞株 MCF-7^[7]、子宫内膜癌细胞株 HEC-1a^[8]、结肠癌细胞株 HCT-116^[9] 和少数几种恶性血液病细胞株^[10-11]等,但胰岛素抑制白血病(或肿瘤)细胞生长的研究国内外均未见报道。本研究通过观察胰岛素对 K562 细胞增殖、凋亡的影响,探讨高浓度胰岛素对其的作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

K562 细胞由福建医科大学附属协和医院血液病研究所惠赠;重和林 R(重组人胰岛素注射液,规格 300 U/3 mL)为拜耳医药保健有限公司产品;胎牛血清为杭州四季青公司产品;RPMI1640 培养液为 Hyclone 公司产品;CCK-8 试剂盒为碧云天公司产品;碘化丙啶(PI)试剂盒及 Annexin V-FITC 试剂盒为 Invitrogen 公司产品;IGF-1 为 Peprotech 公司产品;IGF-1 受体非特异性阻滞剂苏拉明(Suramin)为 Sigma 公司产品;台盼蓝试剂为上海试剂三厂产品。

1.2 细胞培养

K562 细胞以含 50 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基悬浮,放入 37 °C、50 mL/L CO₂、95% 相对湿度的培养箱中培养,每天用倒置显微镜观察培养细胞的生长情况,每隔 2~3 d 用含 50 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基半量换液 1 次。

1.3 实验分组

取对数生长期细胞,然后将细胞浓度调整为 1.0×10^5 mL⁻¹,实验组加入不同终浓度的胰岛素

[和 IGF-1 或 Suramin],对照组为未进行任何处理的与实验组等体积的 K562 细胞悬液,空白组为培养孔内仅有与实验组等体积的无血清培养液,每组设 5 个重复孔,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。

1.4 不同浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的影响

分别采用 CCK-8 法^[12]、细胞计数法^[13]及台盼蓝拒染法^[14]检测不同浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的影响:实验组每组加入不同浓度的胰岛素,使胰岛素终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1、1.6、3.2、10、100 mU/mL,实验组、对照组和空白组分别孵育 24 h、48 h 和 72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,再孵育 2 h,在 450 nm 处测吸光度(A)值,并计数细胞密度和活细胞百分率。

1.5 培养基中葡萄糖浓度变化对高浓度胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响

在上述实验组(胰岛素终浓度分别为 1、10、100 mU/mL)、对照组和空白组培养过程中,每间隔 8 h 各取一滴细胞悬液用台欣 T513 末梢血糖分析仪检测培养基中葡萄糖浓度及计数 K562 细胞密度。

1.6 流式细胞术检测 K562 细胞凋亡率

实验组每组加入不同浓度的胰岛素,使胰岛素终浓度分别为 0.1、1、10、100 mU/mL,孵育 48 h 后,收集各组细胞,用 Annexin V/PI 双染法通过流式细胞术^[15]检测各组细胞的凋亡率。流式细胞仪分析,获得由 4 个象限组成的细胞直方图,左下象限代表正常细胞(An⁻PI⁻),右下象限代表早期凋亡细胞(An⁺PI⁻),右上象限代表晚期凋亡细胞(An⁺PI⁺),左上象限代表坏死细胞(An⁻PI⁺)。

1.7 不同浓度 IGF-1 影响胰岛素对 K562 细胞增殖抑制作用的观察

实验组加入不同浓度的胰岛素和 IGF-1,使各组胰岛素和 IGF-1 终浓度分别为 0.8 mU/mL 胰岛素、8 mU/mL 胰岛素、0.8 mU/mL 胰岛素 + 3 ng/mL IGF-1、0.8 mU/mL 胰岛素 + 0.3 ng/mL IGF-1、0.8 mU/mL 胰岛素 + 0.03 ng/mL IGF-1、8 mU/mL 胰岛素 + 30 ng/mL IGF-1、8 mU/mL 胰岛素 + 3 ng/mL IGF-1、8 mU/mL 胰岛素 + 0.3 ng/mL IGF-1、8 mU/mL 胰岛素 + 0.03 ng/mL IGF-1,实验组、对照组和空白组分别孵育 24 h、48 h 和 72 h 后测 A 值,并计数细胞密度和活细胞百分率。

1.8 不同浓度 Suramin 影响胰岛素对 K562 细胞增殖抑制作用的观察

实验组加入不同浓度的胰岛素和 Suramin, 使实验各亚组胰岛素和 Suramin 终浓度分别为 0.8 mU/mL 胰岛素、8 mU/mL 胰岛素、0.8 mU/mL 胰岛素 + 50 μg/mL Suramin、0.8 mU/mL 胰岛素 + 100 μg/mL Suramin、0.8 mU/mL 胰岛素 + 300 μg/mL Suramin、8 mU/mL 胰岛素 + 50 μg/mL Suramin、8 mU/mL 胰岛素 + 100 μg/mL Suramin、8 mU/mL 胰岛素 + 300 μg/mL Suramin, 对实验组、对照组和空白组分别孵育 24 h、48 h 和 72 h 后测 A 值, 并计数细胞密度和活细胞百分率。

1.9 统计学方法

根据资料的性质选用单因素方差分析及双因素

析因设计资料的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素对 K562 细胞增殖的影响

不同浓度胰岛素分别作用 K562 细胞 24 h、48 h、72 h 后, 结果显示, 在 0.1~1 mU/mL 浓度下胰岛素促进细胞增殖, 随胰岛素浓度升高促进细胞增殖作用逐步增强、细胞存活率逐渐增高(1 mU/mL 为最适浓度), 呈量效和时效关系, 而高浓度胰岛素(1.6~100 mU/mL)抑制细胞增殖, 也呈量效和时效关系, 见表 1。

表 1 不同浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

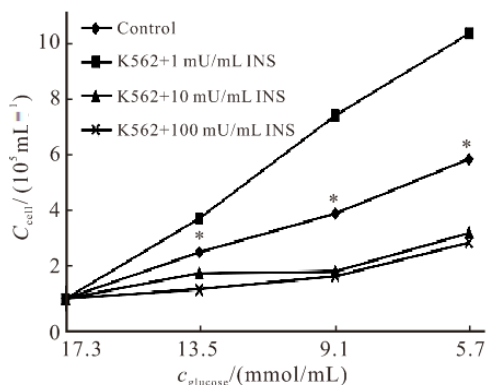
Table 1 Effect of different concentrations of insulin on K562 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Insulin concentration/ (mU/mL)	24 h		48 h		72 h	
	Cell population/ (10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/ (10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/ (10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%
0	2.55±0.03	87±2	4.42±0.05	89±2	5.67±0.05	90±1
0.1	2.77±0.04*	88±2*	4.73±0.06*·△	90±2*·△	6.18±0.06*·△	91±2*·△
0.2	2.81±0.03*	90±2*	5.20±0.05*·△	92±2*·△	6.48±0.05*·△	93±1*·△
0.4	2.97±0.03*	91±1*	6.72±0.06*·△	94±2*·△	6.87±0.06*·△	95±2*·△
0.8	3.47±0.04*	92±2*	7.98±0.07*·△	96±2*·△	8.27±0.07*·△	97±1*·△
1	4.94±0.06*	94±2*	9.22±0.08*·△	97±2*·△	9.88±0.08*·△	99±1*·△
1.6	1.96±0.03*	86±2*	3.20±0.05*·△	87±3*·△	4.77±0.05*·△	90±2*·△
3.2	1.91±0.03*	81±3*	1.97±0.04*·△	83±3*·△	3.70±0.05*·△	86±3*·△
10	1.24±0.03*	77±3*	1.57±0.04*·△	80±3*·△	2.61±0.04*·△	82±3*·△
100	1.04±0.03*	74±3*	1.42±0.03*·△	76±3*·△	2.31±0.04*·△	79±2*·△

* $P < 0.05$, vs. former concentration at the same time point; △ $P < 0.05$, vs. former time point in the same concentration group

2.2 培养基中葡萄糖浓度变化对高浓度胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响

结果显示(附图), 无论培养基中葡萄糖浓度高低, 高浓度胰岛素(10 mU/mL 和 100 mU/mL)都有对 K562 细胞增殖的抑制作用。



附图 培养基葡萄糖浓度对胰岛素抑制 K562 细胞增殖的影响

Fig Effect of glucose levels in the culture medium on the inhibitory effect of insulin to the K562 cell proliferation

* $P < 0.05$, vs. the other groups at the same glucose concentrations (13.5, 9.1, and 5.7 mmol/L)

2.3 不同浓度胰岛素对 K562 细胞凋亡的影响

0.1、1、10、100 mU/mL 胰岛素处理 K562 细胞 48 h 时, 细胞凋亡率分别为 16.13%±1.13%、1.58%±0.39%、29.3%±1.70%、34.99%±1.77%, 而对照组凋亡率为 16.56%±0.82%, 各实验组与对照组之间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明: 胰岛素在 0.1、1 mU/mL 浓度下抑制细胞凋亡(1 mU/mL 为最适浓度), 而高浓度胰岛素(10、100 mU/mL)促进细胞凋亡, 并具有量效关系($P < 0.05$)。

2.4 IGF-1 对低浓度(0.8 mU/mL)胰岛素促 K562 细胞增殖作用的影响

结果显示(表 2), 不同浓度(0.003~3 ng/mL) IGF-1 增强了 0.8 mU/mL 胰岛素促进细胞增殖的作用, 并具有量效和时效关系。

2.5 IGF-1 对高浓度(8 mU/mL)胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响

与低浓度(0.8 mU/mL)胰岛素相比, 高浓度(8 mU/mL 胰岛素)浓度增长为其 10 倍, 考虑到配体与受体的竞争性结合特点, 选择 IGF-1 浓度范围为 0.03~30 ng/mL。不同浓度(0.03~30 ng/mL) IGF-1 和 8 mU/mL 胰岛素共同作用 K562 细胞 24 h、48 h、

72 h,结果显示,IGF-1 逆转了高浓度胰岛素抑制细胞增殖的活性,并具有量效和时效关系,见表 3。

表 2 IGF-1 对 0.8 mU/mL 胰岛素促进 K562 细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Role of IGF-1 on the proliferation of K562 cells in the presence of 0.8 mU/mL insulin ($\bar{x} \pm s, n=15$)

IGF-1 concentration/(ng/mL)	24 h		48 h		72 h	
	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%
0	0.95±0.01	83±2	2.12±0.02	86±1	2.95±0.02	89±1
0.003	1.20±0.02*	85±1*	3.18±0.03*·△	89±1*·△	4.00±0.04*·△	90±1*·△
0.03	1.28±0.02*	86±1*	3.73±0.03*·△	89±1*·△	4.92±0.04*·△	92±1*·△
0.3	1.30±0.02*	89±1*	4.23±0.03*·△	92±1*·△	5.43±0.04*·△	94±2*·△
3	1.57±0.02*	91±2*	4.78±0.03*·△	95±1*·△	6.23±0.04*·△	97±2*·△

*·△ denote the same as those table 1

表 3 IGF-1 对 8 mU/mL 胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 3 Role of IGF-1 in the inhibitory effect of high insulin concentrations on K562 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n=15$)

IGF-1 concentration/(ng/mL)	24 h		48 h		72 h	
	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%
0	0.87±0.02	69±2	0.92±0.02	71±1	1.90±0.03	76±2
0.03	0.88±0.03*	75±2*	2.45±0.05*·△	80±1*·△	3.42±0.05*·△	83±1*·△
0.3	0.93±0.02*	79±1*	3.28±0.04*·△	83±1*·△	4.03±0.03*·△	88±1*·△
3	1.35±0.03*	87±1*	4.25±0.04*·△	95±1*·△	5.68±0.03*·△	96±1*·△
30	1.62±0.04*	92±1*	5.07±0.04*·△	97±1*·△	6.53±0.03*·△	98±1*·△

*·△ denote the same as those in table 1

2.6 不同浓度 Suramin 对低浓度(0.8 mU/mL)胰岛素促 K562 细胞增殖作用的影响

不同浓度(50~300 $\mu\text{g/mL}$)的 Suramin 和

0.8 mU/mL 胰岛素共同作用 K562 细胞 24 h、48 h、72 h 后, Suramin 抑制了 0.8 mU/mL 胰岛素促进细胞增殖的作用,并具有量效和时效关系,见表 4。

表 4 Suramin 对 0.8 mU/mL 胰岛素促进 K562 细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Role of Suramin in K562 cell proliferation induced by 0.8 mU/mL insulin ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Suramin concentration/($\mu\text{g/mL}$)	24 h		48 h		72 h	
	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population (10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%
0	2.42±0.03	93±2	7.72±0.05	99±1	7.90±0.04	99±1
50	1.83±0.03*	86±1*	2.32±0.04*·△	89±1*·△	4.17±0.05*·△	94±1*·△
100	1.06±0.06*	83±1*	1.55±0.06*·△	87±1*·△	2.38±0.05*·△	90±2*·△
300	1.03±0.05*	79±2*	1.18±0.06*·△	82±1*·△	2.08±0.05*·△	86±1*·△

*·△ denote the same as those in table 1

2.7 不同浓度 Suramin 对高浓度(8 mU/mL)胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响

不同浓度(50~300 $\mu\text{g/mL}$)的 Suramin 和

8 mU/mL 胰岛素共同作用 K562 细胞 24 h、48 h、72 h,结果显示, Suramin 增强了高浓度胰岛素抑制细胞增殖的活性,并具有量效和时效关系,见表 5。

表 5 Suramin 对 8 mU/mL 胰岛素抑制 K562 细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 5 Role of Suramin in the inhibition of high concentration insulin-dependent K562 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Suramin concentration/($\mu\text{g/mL}$)	24 h		48 h		72 h	
	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population/(10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%	Cell population (10^5 mL^{-1})	Proportion of living cells/%
0	1.88±0.02	89±1	4.15±0.05	93±1	5.48±0.05	96±1
50	1.10±0.03*	87±1*	1.68±0.04*·△	90±1*·△	1.93±0.04*·△	92±2*·△
100	1.04±0.03*	81±2*	1.20±0.03*·△	87±1*·△	1.32±0.04*·△	89±1*·△
300	0.83±0.03*	75±2*	1.00±0.04*·△	80±1*·△	1.15±0.03*·△	84±1*·△

*·△ denote the same as those in table 1

3 讨论

正常人空腹胰岛素水平波动在 10~20 $\mu\text{U/mL}$ 之间,餐后胰岛素峰值为空腹的 5~10 倍,因而我们界定胰岛素浓度在 0.1~1 mU/mL 为低浓度胰岛素,浓度>1 mU/mL 为高浓度胰岛素。本实验结

果表明:胰岛素对 K562 细胞具有双重作用,在胰岛素浓度下为 0.1~1 mU/mL 有显著促进细胞增殖、抑制凋亡的作用,呈现时间和剂量依赖关系,胰岛素最强的促增殖浓度为 1 mU/mL;而高浓度胰岛素(1.6~100 mU/mL)却有显著抑制细胞增殖、诱导凋亡的作用,呈现时间和剂量依赖关系,胰岛素最强

的抑制增殖浓度为 100 mU/mL,从促进增殖转到抑制增殖拐点浓度在 1~1.6 mU/mL 之间,具体的拐点浓度尚需进一步明确。

高浓度胰岛素是否通过降低培养基中的葡萄糖浓度从而抑制 K562 细胞的增殖呢?按常理推测:高浓度胰岛素是通过消耗培养基中的葡萄糖,造成培养基中的葡萄糖浓度过低进而抑制 K562 细胞增殖。但本次实验结果否定此推测,结果显示:在相同培养基葡萄糖浓度条件下,不同浓度胰岛素对 K562 细胞增殖的影响不同,胰岛素在 1 mU/mL 低浓度下具有促进 K562 细胞增殖的作用,高浓度胰岛素(10 和 100 mU/mL)具有明显地抑制 K562 细胞增殖的作用;而在不同培养基葡萄糖浓度(17.3、13.5、9.1 和 5.7 mmol/L)下,两种高浓度胰岛素(10 和 100 mU/mL)抑制 K562 细胞增殖的作用结果相同,表明无论培养基中葡萄糖浓度高低,高浓度胰岛素(10 和 100 mU/mL)都有对 K562 细胞增殖的抑制作用。这说明高浓度胰岛素对人白血病细胞 K562 增殖的抑制作用与细胞内的葡萄糖代谢无关。

胰岛素是通过何种途径影响 K562 细胞增殖和凋亡呢?本实验结果显示:IGF-1 能逆转高浓度胰岛素对于 K562 细胞增殖的抑制作用,进一步说明高浓度胰岛素抑制 K562 细胞增殖是通过抑制 IGF-1 途径而发挥作用的;Suramin 能增强高浓度胰岛素对于 K562 细胞增殖的抑制作用,也表明抑制 IGF-1 途径是高浓度胰岛素抑制 K562 细胞增殖可能的机制之一^[16]。但高浓度胰岛素是在与 IGF-1 受体结合前发挥作用,还是在与 IGF-1 受体结合后通过某种信号传导通路(PI3K 和/或 MAPK)发挥作用?这些信号传导通路中相关信号分子的变化如何?尚需进一步研究。近年来从分子水平研究证实,胰岛素也属于生长因子家族,胰岛素受体(INSR)与胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)同属酪氨酸激酶膜受体家族,并共享同一受体后信号传导通路,因此胰岛素除了具有代谢调节作用外还可能以其生长因子样的作用直接或间接地影响细胞增殖、分化、凋亡。研究发现,多种组织细胞包括人红白血病细胞株(K562)、人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株(Jurkat)等分别表达 INSR、IGF-1R、IGF-2R 或三者均有表达^[17-19],IGF-1R 和 IGF-2R 的结构与 INSR 相似,它们与 IGF-1、IGF-2 及胰岛素的亲和力从大到小分别为:①INSR:胰岛素>IGF-1>IGF-2;②IGF-1R:IGF-1>IGF-2>胰岛素;③IGF-2R:IGF-2>IGF-1。胰岛素不能与 IGF-2R 结合。

胰岛素和 IGF-1 都可以与对方的受体相结合,尽管这种结合力同它们与自己的受体的结合力相比要微弱得多^[20]。胰岛素可以通过自己的受体刺激细胞的增殖与分化,高浓度下这种作用则也可以由 IGF-1R 介导^[21]。IGFR 被激活后,主要发挥细胞增殖、分化作用^[22],而当胰岛素与 IGF-1R 结合后,促细胞增殖作用比 IGF-1 与 IGF-1R 结合的促增殖作用明显减弱。因此,当培养基中胰岛素处于高浓度水平,其足以有效地与 IGF-1 竞争、并优先与 IGF-1R 结合,从而表现出 K562 细胞在培养基中增殖减弱^[23]。

综上所述,本研究发现:胰岛素在低浓度(0.1~1 mU/mL)下有显著促进 K562 细胞增殖、抑制 K562 细胞凋亡的作用,呈现时间和剂量依赖关系;而高浓度胰岛素(1.6~100 mU/mL)却有显著抑制 K562 细胞增殖、诱导 K562 细胞凋亡的作用,呈现时间和剂量依赖关系;高浓度胰岛素对人白血病细胞 K562 增殖的抑制作用与培养基中葡萄糖代谢无关;高浓度胰岛素可能是通过抑制 IGF-1 途径从而抑制 K562 细胞增殖、诱导 K562 细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] LANN D, LEROITH D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008, 13(4): 371-379.
- [2] WOLPIN BM, MICHAUD DS, GIOVANNUCCI EL, *et al.* Circulating insulin-like growth factor binding protein-1 and the risk of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7923-7928.
- [3] LEIBIGER B, MOEDE T, UHLES S, *et al.* Insulin-feedback via PI3K-C2alpha activated PKBalpha/Akt1 is required for glucose-stimulated insulin secretion. *FASEB J*, 2010, 24(6): 1824-1837.
- [4] HUANG SS, LEAL SM, CHEN CL, *et al.* Identification of insulin receptor substrate proteins as key molecules for the TbetaR-V/LRP-1-mediated growth inhibitory signaling cascade in epithelial and myeloid cells. *FASEB J*, 2004, 18(14): 1719-1721.
- [5] FRESNO VJA, CASADO E, DE CASTRO J, *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193-204.
- [6] 庄伟煌, 潘敬新. 胰岛素对人白血病细胞增殖的影响. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(1): 269-273.
- [7] VAZQUEZ-MARTIN A, OLIVERAS-FERRAROS C, CUFI S, *et al.* Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. *Curr Mol Med*, 2010, 10(7): 674-691.
- [8] ZHANG G, LI X, ZHANG L, *et al.* The expression and role of hybrid insulin/insulin-like growth factor receptor type 1 in endometrial carcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 200(2): 140-148.
- [9] ADACHI Y, YAMAMOTO H, OHASHI H, *et al.* A

- candidate targeting molecule of insulin-like growth factor- I receptor for gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol*, 2010,16(46):5779-5789.
- [10] SCHEEN AJ, LEFEBVRE PJ. Insulin glargine and cancer: a storm in a glass of water? *Rev Med Liege*, 2009,64(9):440-445.
- [11] AUMILLER J. Relationship between diabetology and oncology. Cancer alarm initially without practical consequences. *MMW Fortschr Med*, 2009,151(42):16.
- [12] LOU J, CHU G, ZHOU G, *et al.* Comparison between two kinds of cigarette smoke condensates (CSCs) of the cytogenotoxicity and protein expression in a human B-cell lymphoblastoid cell line using CCK-8 assay, comet assay and protein microarray. *Mutat Res*, 2010,697(1/2):55-59.
- [13] MUMBA ND, MENTEN J, PYANA PP, *et al.* Stage determination in sleeping sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection techniques. *Trop Med Int Health*, 2013,18(6):778-782.
- [14] HUMPE A, BECK C, SCHOCH R, *et al.* Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34⁺ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. *Transfusion*, 2005,45(7):1208-1213.
- [15] MAYLE A, LUO M, JEONG M, *et al.* Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry A*, 2013,83(1):27-37.
- [16] CHENAL J, PIERRE K, PELLERIN L. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Eur J Neurosci*, 2008,27(1):53-65.
- [17] WAHNER HAE, HALUSKA P, SCHNEIDER PA, *et al.* Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-I receptor in human acute myelogenous leukemia; effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 *in vitro*. *Cancer Res*, 2009,69(19):7635-7643.
- [18] NAVENOT JM, FUJII N, PEIPER SC. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Mol Pharmacol*, 2009,75(5):1074-1083.
- [19] MIRSHAHI P, RAFII A, VINCENT L, *et al.* Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 2009,23(6):1039-1048.
- [20] BACK K, BRANMARK C, STRALFORS P, *et al.* Differential effects of IGF- I , IGF- II and insulin in human preadipocytes and adipocytes--role of insulin and IGF- I receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 2011,339(1/2):130-135.
- [21] DENLEY A, CARROLL JM, BRIERLEY GV, *et al.* Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol*, 2007,27(10):3569-3577.
- [22] MENG D, SHI X, JIANG BH, *et al.* Insulin-like growth factor- I (IGF- I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 2007,42(11):1651-1660.
- [23] SURINYA KH, FORBES BE, OCCHIODORO F, *et al.* An investigation of the ligand binding properties and negative cooperativity of soluble insulin-like growth factor receptors. *J Biol Chem*, 2008,283(9):5355-5363.

(2015 - 07 - 06 收稿, 2015 - 11 - 06 修回)

编辑 余琳

(上接第 320 页)

- [4] GUBBELS JA, CLAUSSEN N, KAPUR AK, *et al.* The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2010(3):8. doi:10.1186/1757-2215-3-8.
- [5] HAN LY, KIPPS E, KAYE SB. Current treatment and clinical trials in ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010,19(4):521-534.
- [6] MOSS C, KAYE SB. Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management. *Eur J Cancer*, 2002,38(13):1701-1707.
- [7] ROSELL R, LORD RV, TARON M, *et al.* DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2002,38(3):217-227.
- [8] JORDAN P, CARMO-FONSECA M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 2000;57(8-9):1229-1235.
- [9] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, PAYNE CM, *et al.* DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res*, 2002,511(2):145-178.
- [10] LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998,396(6712):643-649.
- [11] ABRAHAM RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001,15(17):2177-2196.
- [12] CRISTIANO BE, CHAN JC, HANNAN KM, *et al.* A specific role for AKT3 in the genesis of ovarian cancer through modulation of G(2)-M phase transition. *Cancer Res*, 2006,66(24):11718-11725.
- [13] HELLEDAY T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol*, 2011,5(4):387-393.
- [14] SNYDER AR, ZHOU J, DENG Z, *et al.* Therapeutic doses of hydroxyurea cause telomere dysfunction and reduce trf2 binding to telomeres. *Cancer Biol Ther*, 2009,8(12):1136-1145.
- [15] CREGAN SP, DAWSON VL, SLACK RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase independent cell death. *Oncogene*, 2004,23(16):2785-2796.

(2015 - 09 - 08 收稿, 2015 - 12 - 13 修回)

编辑 余琳