

VEGF 对大鼠胰岛瘤细胞增殖、凋亡及胰岛素分泌功能的影响^{*}

邓浩¹, 丁振宇², 王椿³, 李双庆^{1△}, 何詠⁴, 梁立波¹

1. 四川大学华西医院 全科医学科 (成都 610041); 2. 四川大学华西医院 肿瘤中心胸部肿瘤科 生物治疗国家重点实验室 (成都 610041);
3. 四川大学华西医院 内分泌科 (成都 610041); 4. 四川大学华西医院 检验科 (成都 610041)

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对大鼠胰岛瘤细胞(INS-1)增殖、凋亡、胰岛素分泌以及相关基因表达的影响。方法 用不同浓度(0、40、80、160 ng/mL) VEGF 对大鼠 INS-1 细胞进行处理,采用 CCK-8 试剂盒检测 INS-1 细胞增殖,用 Annexin V 及碘化丙啶(PI)双染试剂检测细胞凋亡; INS-1 细胞经 VEGF 处理后做标准葡萄糖刺激的胰岛素分泌实验,ELISA 法检测胰岛素,实时定量 PCR 技术检测胰岛分泌过程中相关基因表达,Western blot 检测 VEGF 对 Insulin 蛋白表达的影响。结果 不同浓度 VEGF 对 INS-1 细胞作用 24 h、48 h、72 h,其细胞活性均无明显变化($P>0.05$)。但当 VEGF 浓度为 80 ng/mL 和 160 ng/mL 时对细胞凋亡具有抑制作用($P<0.01$)。高糖状态下当 VEGF 浓度为 40 ng/mL 时,VEGF 对胰岛素的分泌具有抑制作用。不同浓度 VEGF 作用于 INS-1 细胞后,磺酰脲类受体基因(sulfonylurea receptor, *Sur*)、内向整流性钾离子通道基因(inwardly rectifying potassium channel 6.2, *Kir6.2*)的表达随 VEGF 浓度增高呈下降趋势,葡萄糖激酶基因(glucokinase, *GCK*)的表达先降低后升高,葡萄糖转运蛋白基因 2(glucose transporter 2, *Glut2*)表达呈先升高后降低趋势,Insulin 蛋白的表达量随 VEGF 浓度增高呈逐渐下降趋势。结论 VEGF 在高糖状态下对细胞凋亡和胰岛素分泌有抑制作用,为探索 VEGF 在糖代谢中的作用提供了新的线索。

【关键词】 血管内皮生长因子 葡萄糖依赖胰岛素释放试验 胰岛素

Effects of VEGF on Proliferation, Apoptosis and Insulin Secretion in Rat Pancreatic Islet Cells DENG Hao¹, DING Zhen-yu², WANG Chun³, LI Shuang-qing^{1△}, HE He⁴, LIANG Li-bo¹. 1. Department of General Practice, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Division of Thoracic Cancer, Cancer Center, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lsqhjk@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on proliferation, apoptosis, insulin secretion and related gene expression in rat pancreatic islet cell (INS-1). **Methods** INS-1 cells were treated with different concentrations of VEGF. CCK-8 kit was used to detect the proliferation of INS-1 cells and the cell apoptosis were evaluated by using Annexin V and propidium iodide (PI) double staining kit. INS-1 cells were treated with VEGF and the standard glucose stimulated insulin secretion test with ELISA was conducted. The expression of related genes in pancreatic islets was detected by real-time quantitative PCR. The effect of VEGF on insulin protein expression was evaluated with Western blot. **Results** No significant changes ($P>0.05$) in INS-1 cells were observed after treated with different concentrations of VEGF at 24 h, 48 h and 72 h. But when VEGF concentration were 80 ng/mL and 160 ng/mL, an inhibitory effect on cell apoptosis were noticed ($P<0.01$). The addition of VEGF to the high-glucose media significantly reduced the release of insulin at the concentration of 40 ng/mL. A decreasing trends of the expression level of sulfonylurea receptor gene (*Sur*), inwardly rectifying potassium channel gene 6.2 (*Kir6.2*) as well as the release of insulin were noticed as the increasing of VEGF concentrations. The expression of glucokinase gene (*GCK*) first decreased and then increased, but the expression of glucose transporter gene 2 (*Glut 2*) were increased first and then decreased. **Conclusion** VEGF inhibited the secretion of insulin from INS-1 cells in the high-glucose condition. Our study provides new clues to the function of VEGF on the glucose metabolism.

【Key words】 VEGF Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) Insulin

* 国家自然科学基金(No. 82172684, No. 81200640)资助

△ 通讯作者, E-mail: lsqhjk@126.com

糖尿病是多种因素引起的以高血糖为特征的代谢性疾病,已经成为继肿瘤、心血管疾病之后的第三大危害人类健康和生命安全的疾病。我国成年人糖尿病的患病率约为 11.6%,并且以 8.1%的增长速度逐年递增^[1]。糖尿病的主要发病机制为胰岛素分泌相对不足(胰岛素抵抗)或者胰岛素绝对不足(1 型糖尿病及 2 型糖尿病后期)而引起的高血糖症状。因此研究胰岛素的分泌机制及影响因素对预防及治疗糖尿病具有重要意义^[1,2]。

细胞因子广泛参与胰岛细胞胰岛素的分泌,如成纤维细胞生长因子 21 可促进胰岛素分泌的增加^[3];在 2 型糖尿病中促生长素-C 具有减少胰岛素分泌及增加胰岛素受体的表达的作用等^[4];因此,深入研究细胞因子对胰岛素分泌的调节具有重要意义。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是具有多种生物学活性的细胞因子。VEGF 具有强烈的促血管生成作用,能增加血管内皮细胞的通透性,刺激血管内皮细胞的分裂及游走^[3-5]。研究表明 VEGF 对胰岛瘤细胞的增殖和凋亡具有促进作用,且促进增殖的作用大于促进凋亡的作用^[5]。同时,VEGF 在糖尿病足病、糖尿病肾病以及糖尿病视网膜病变患者中表达增高^[6],因而 VEGF 可能参与了糖尿病的发生发展。为进一步探讨 VEGF 对胰岛素分泌的影响,我们通过用不同浓度 VEGF 对大鼠胰岛瘤细胞(INS-1)进行处理,观察 INS-1 细胞增殖、凋亡、胰岛素分泌功能以及相关基因表达的变化,对 VEGF 的作用机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

大鼠 INS-1 细胞源自 X 线照射的移植胰岛瘤的大鼠,用于研究 β 细胞功能,本实验 INS-1 细胞系瑞士日内瓦大学 Wollheim 教授馈赠。细胞培养于 RPMI 1640 (Hyclone 公司),含有 10% 胎牛血清(Gibico 公司)、0.11 g/L L-谷氨酰胺、0.11 g/L 丙酮酸钠、50 μ mol/L β -巯基乙醇(南京凯基生物)及双抗(100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,四川化工生物公司),置细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养。Annexin V 及碘化丙啶(PI,南京凯基生物)。VEGF、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1)及干扰素(IFN)购自 PeproTech 公司。Cell-counting kit (CCK-8)试剂盒(博奥森公司)。ELISA 胰岛素检测试剂盒(Millipore 公司)。RNA 提取试剂盒

及TM RT-PCR Kit 试剂盒购自凯基生物。兔抗鼠胰岛素单克隆抗体(博奥森公司)。核酸定量试剂盒(NanoDrop2000, Equi-Thermo SCIENTIFIC 公司)。RIPA 裂解液(南京凯基生物)。Cooktail 蛋白酶抑制(Beijing Leagene Biotechnology)。BCA(南京凯基生物)。 β -actin 兔抗鼠多克隆抗体、HRP-羊抗兔 IgG 抗体(华安生物)。

1.2 VEGF 对 INS-1 细胞活性的影响

采用 CCK-8 法检测细胞活性。接种 INS-1 细胞 1×10^5 /孔于 96 孔板中,孵育 24 h 后替换培养液,加入不同浓度(0、40、80、160 ng/mL) VEGF,孵育 24 h、48 h、72 h,然后在每孔中直接加入 10 μ L CCK-8,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 2 h,振荡 10 s,用 Spectrafluor Plus 光度仪于 450 nm 测定光密度(OD₄₅₀)值,OD 值的改变表示细胞活力的改变。未经 VEGF 处理的细胞作为正常对照,其细胞活力设定为 100%。

1.3 VEGF 对 INS-1 细胞凋亡的影响

采用 Annexin V 及 PI 双染检测细胞凋亡。实验分别分为阴性对照组、不同浓度(40、80、160 ng/mL) VEGF 组、IL-1(5 ng/mL) + IFN(100 ng/mL) + TNF(100 ng/mL)诱导凋亡组(阳性对照组)、不同浓度 VEGF(40、80、160 ng/mL) + IL-1 + IFN + TNF 组(IL-1、IFN、TNF 剂量同阳性对照组)。接种 INS-1 细胞 1×10^5 /孔于 12 孔板中,孵育 24 h 后按上述不同方式在高糖培养基(糖浓度为 11.1 mmol/L)中处理 48 h,然后收集细胞于样品管中,1 300 r/min 离心 3 min,使用 PBS 漂洗 3 次,然后每个管中加入 500 μ L binding buffer,每个管中分别加入 5 μ L FITC-Annexin V 和 5 μ L PI,使用流式细胞仪进行检测。

1.4 葡萄糖依赖胰岛素释放试验(GSIS)

实验分为高糖组(16.7 mmol/L)和低糖组(5.6 mmol/L)。接种 INS-1 细胞于 6 孔板中,分别在高糖(16.7 mmol/L)和低糖(5.6 mmol/L)两种培养基中孵育 24 h 后替换培养液,加入不同浓度(0、40、80、160 ng/mL) VEGF,孵育 48 h。按常规方法进行 GSIS。INS-1 细胞用 KRHB 缓冲液(mmol/L)(NaCl 118, KCl 4.4, MgCl_2 1.2, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 5.0, Glucose 2.8, HEPERS 10, 0.2% BSA, pH7.4)洗涤 2 次,加入含有 5.6 mmol/L 和 16.7 mmol/L 葡萄糖的培养基孵育 1.5 h。收集上清液,采用大鼠 ELISA 胰岛素检测试剂盒检测胰岛素。

1.5 定量 PCR 检测 VEGF 对胰岛分泌过程中相关基因表达的影响

预实验发现高糖培养基状态下,VEGF 对 INS-1 细胞的胰岛素分泌产生了显著影响,故我们在高糖培养基(16.7 mmol/L)状态下检测了胰岛素分泌相关经典基因的表达量,包括磺酰脲类受体基因(sulfonylurea receptor, *Sur*)、内向整流性钾离子通道基因(inwardly rectifying potassium channel 6.2, *Kir6.2*),葡萄糖激酶基因(glucokinase, *GCK*),葡萄糖转运蛋白基因 2 (glucose transporter 2, *Glut2*)。INS-1 细胞按 1.4 高糖组处理后,提取细胞总 RNA。经核酸定量后使用™ RT-PCR Kit 根据说明书进行逆转录。各基因引物由上海瑞博生物工程公司合成。基因引物序列如下。Insulin 上游: 5'-CTACAGTCGGAAACCATCAGCA-3', 下游: 5'-CCACCAAGTGAGAACCACAAAG-3', 166 bp (编号 NM_019130.2); *GCK* 上游: 5'-CACCCAGAAAGGCTCAGAAAG-3', 下游: 5'-AGCATCACTCTGAAGTTGGTTCCT-3', 72 bp (编号 NM_012565.1); *Glut2* 上游: 5'-CAGCTGTCTCTGTGCTGCTTGT-3', 下游: 5'-GCCGTCATGCTCACATAACTCA-3', 151 bp (编号 NM_012879.2); *Sur* 上游: 5'-CAAGGTTCGTAAACCGCAAGC-3', 下游: 5'-AGGGGTCCAGGTGAAGAAGAAGC-3', 142 bp (编号 NM_013039.2); *Kir6.2* 上游: 5'-TGTCCTCGAAACGGCATTATC-3', 下游: 5'-ATGTTCTTGTGGGCGACGTT-3', 142 bp (编号 NM_031358.3)。实时荧光定量 PCR 反应依试剂盒说明操作两步法:预变性与变性条件各基因基本一样,95 ℃ 预变性 5 min,然后 95 ℃ 20 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。最后 72 ℃ 延伸 5 min。以 β -actin 为内对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量,并以对照组各基因相对表达量为 1。

1.6 Western blot 检测 VEGF 对 Insulin 蛋白的影响

INS-1 细胞按 1.4 高糖组处理后,离心收集细胞,提取细胞总蛋白,预冷 PBS 漂洗 2 次,弃上清,再次离心,去尽残留液,将样品置于冰上用添加含有 cooktail 蛋白酶抑制及 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解并用细胞超声破碎仪超声裂解细胞,超速离心后收集上清液。用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 SDS 上样缓冲液煮沸,离心 5 min,取上清。使用 40~200 g/L SDS-PAGE 胶电泳。再将 PAGE 胶中蛋

白转移至 PVDF 膜(Millipore,0.22 μ m)上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。胰岛素一抗采用兔抗鼠胰岛素单克隆抗体(博奥森公司,工作浓度 1:4 000, Cat #: bsm-0855M-HRP); β -actin 一抗为兔抗鼠多克隆抗体(华安生物,工作浓度 1:1 000, Cat #: R1207-1),4 ℃ 孵育过夜, TBST 漂洗后加入 HRP-羊抗兔 IgG 抗体(工作浓度 1:10 000),室温孵育 1.5 h,用 TBST 漂洗,最后加 ECL 化学发光显色液显色。

1.7 统计学方法

各组数据方差齐,采用单因素方差分析,方差不齐则采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF 对 INS-1 细胞活性的影响

见图 1。结果显示,经 VEGF 处理 INS-1 细胞 24 h、48 h、72 h,其细胞活性各组之间差异均无统计学意义。

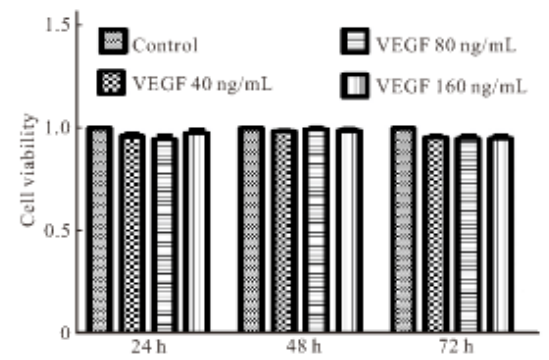


图 1 MTT 法检测 VEGF 对细胞活性的影响
Fig 1 Cell viability as determined by MTT assay

2.2 VEGF 对 INS-1 细胞凋亡的影响

由图 2 可见,IL-1+IFN+TNF 可诱导细胞凋亡,与阴性对照组比较,阳性对照组的差异有统计学意义($P<0.001$);80 ng/mL 和 160 ng/mL VEGF 对细胞凋亡具有抑制作用(与阴性对照组相比, $P_{80}=0.008$, $P_{160}=0.004$)。不同浓度的 VEGF+IL-1+IFN+TNF 组细胞凋亡率与阳性对照组比较有上升趋势,但差异无统计学意义(与阳性对照组相比, $P_{40}=0.553$, $P_{80}=0.121$, $P_{160}=0.402$)。说明 VEGF 对 IL-1+IFN+TNF 诱导的 INS-1 细胞凋亡不具有保护作用。

2.3 不同浓度 VEGF 对 INS-1 细胞 GSIS 功能的影响

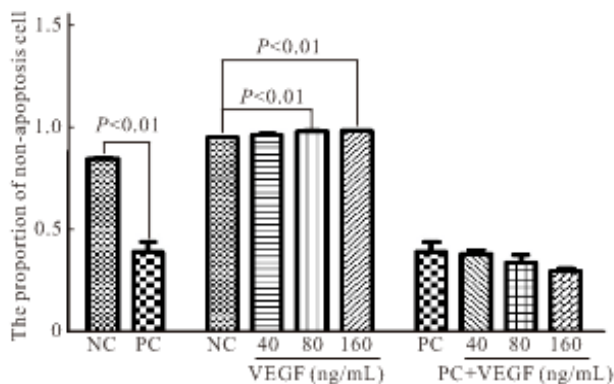


图2 VEGF对INS-1细胞凋亡的影响

Fig 2 Flow cytometry assay of the apoptosis of rates in different groups. NC: Negative control; PC: Positive control

由图3可见,当用VEGF 40 ng/mL处理后,无论高糖组还是低糖组,胰岛素分泌均受到抑制,但仅在高糖组中其与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。在高糖组和低糖组中,随着VEGF浓度逐渐升高,胰岛素分泌量均逐渐升高。

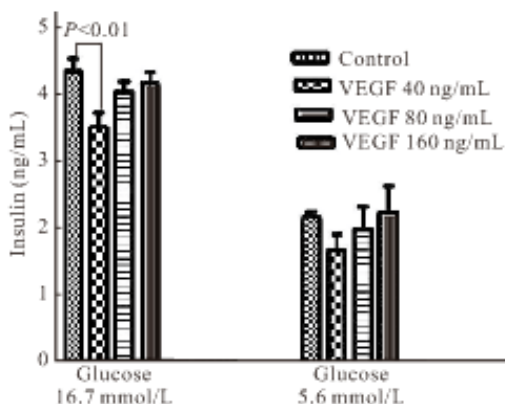


图3 VEGF对不同血糖状态INS-1细胞胰岛素分泌的影响

Fig 3 Effect of VEGF on insulin secretion of INS-1 cells at different glucose status

2.4 VEGF对胰岛分泌过程中相关基因表达的影响

由图4可见,高糖培养基状态下,VEGF作用于INS-1细胞后,*Sur*随VEGF浓度升高表达量呈逐渐上升趋势($P > 0.5$)、*Kir6.2*基因的表达量随VEGF浓度增高呈下降趋势($P > 0.1$),但与对照组比较差异均无统计学意义。*GCK*基因呈现先下降后上升的趋势($P > 0.5$),*Glut2*基因呈先上升后下降的趋势($P > 0.1$),但与对照组比较差异均无统计学意义。

2.5 VEGF对Insulin基因和蛋白的影响

由图5可见,VEGF作用于INS-1细胞后,

Insulin基因的表达随VEGF浓度增高呈上升趋势(图5A),与对照组比较差异无统计学意义。胰岛素蛋白的表达呈先降低后逐渐升高的趋势(图5B)。

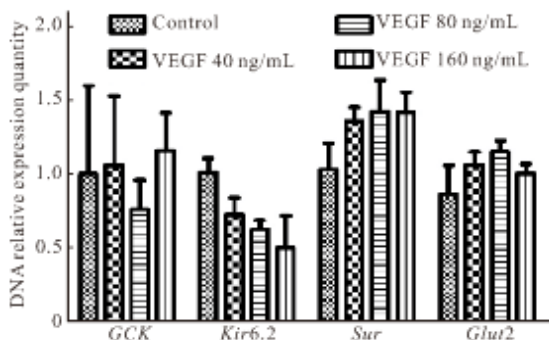


图4 胰岛素依赖葡萄糖分泌试验相关经典基因的表达

Fig 4 Relative expression genes involved in GSIS pathway

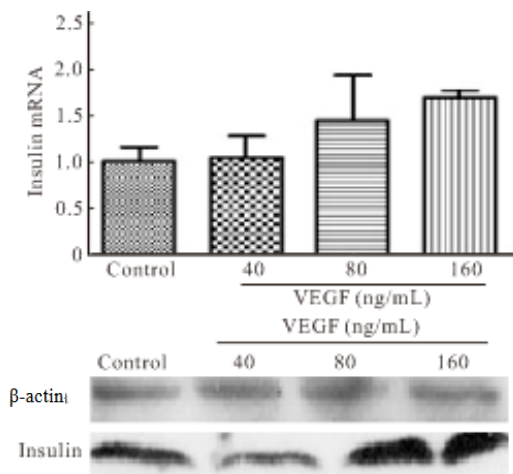


图5 经VEGF处理后胰岛素基因的表达以及Western blot检测蛋白的表达

Fig 5 Relative expression of Insulin mRNA and Western blot of Insulin protein of different groups

3 讨论

Huotari等^[7]的研究表明,VEGF对大鼠胰岛β瘤细胞既有促进增殖也有促进凋亡的作用,且其促进增殖的作用大于其促进凋亡的作用。本实验中,我们采用CCK-8检测不同浓度VEGF处理后INS-1细胞的活性,发现各组细胞活性无明显差异。我们在INS-1常规培养基状态下进行凋亡检测(培养基糖浓度为11.1 mmol/L)。经VEGF处理细胞后,结果发现在VEGF 80 ng/mL和160 ng/mL时非凋亡细胞比例较对照组升高。但是VEGF对IL-1+IFN+TNF诱导INS-1细胞凋亡不具有保护作用。本研究结果提示,VEGF对INS-1细胞的

增殖没有影响,可能对 INS-1 细胞具有一定的保护作用。这与既往研究结果不一致,可能原因是研究的实验方法不尽相同,但仍需要进一步通过不同实验方法重复验证。

我们进一步研究了 VEGF 对 INS-1 细胞分泌功能的影响。分别设立模拟生理血糖及病理高血糖浓度,然后用 VEGF 对细胞进行处理,结果发现当 VEGF 为 40 ng/mL 时,高糖浓度下 VEGF 具有抑制胰岛素分泌的作用($P<0.05$),INS-1 细胞的 GSIS 功能受损;VEGF 浓度升高后,INS-1 细胞的胰岛素分泌功能逐渐恢复。结果提示 VEGF 较低浓度下在高血糖环境时可能影响胰岛素的分泌。有研究表明人体内细胞因子如瘦素、游离脂肪酸等也具有抑制胰岛细胞分泌胰岛素的作用^[8-10]。我们推测可能是体内多个细胞因子共同参与了胰岛素分泌的调节,但还需要进一步研究。

我们同时检测了影响胰岛素分泌途径相关基因的表达。其中 *Sur* 和 *Kir6.2* 基因共同调节胰岛素分泌的开启和关闭,*GCK* 和 *Glut2* 共同构成胰岛细胞表面的血糖浓度感受器。研究结果表明^[11-13],*Kir6.2* 基因表达的改变和胰岛素分泌改变具有相关性,*Kir6.2* 基因表达量降低,使细胞膜电位降低,动作电位减小,影响胰岛细胞胰岛素分泌;也有研究表明 *Kir6.2* 基因表达的缺陷可导致细胞膜钙离子通道功能紊乱,促进胰岛素释放^[14,15]。本研究结果发现,*Kir6.2* 基因的表达量随 VEGF 浓度增高呈下降趋势。因此,当 VEGF 浓度在 40 ng/mL 时,胰岛素分泌下降,但当 VEGF 浓度逐渐升高时,胰岛素分泌却恢复正常,此现象可能跟 *Kir6.2* 的表达量随着 VEGF 浓度增加而逐步降低有关,最终导致细胞膜钙离子通道功能紊乱,提示 VEGF 可能通过影响 *Kir6.2* 基因的表达从而影响胰岛素的分泌。本实验结果中出现 *Insulin* 基因的表达和蛋白质分泌存在不一致,故我们考虑 VEGF 对 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响主要通过胰岛素分泌的基因来影响胰岛素分泌,而血糖感受器可能在 VEGF 导致的胰岛素分泌紊乱的过程中所起作用可能不大。

本研究结果表明 VEGF 对 INS-1 细胞具有一定抗细胞凋亡作用,并可能通过影响胰岛素分泌途径的相关基因表达来影响胰岛素的分泌。VEGF 影响胰岛素分泌的靶点可能用于治疗糖尿病及其并发症,为糖尿病研究提供了新的方向。

研究表明,VEGF 在糖尿病患者体内表达异常性增高,在糖尿病发生发展以及并发症中具有重要

作用^[16-18]。但尚无文献研究 VEGF 对胰岛细胞的影响。本研究首次研究了人体内 VEGF 升高对胰岛细胞的增殖、凋亡以及胰岛功能的影响。该研究对 2 型糖尿病后期胰岛素分泌绝对不足以及胰岛素抵抗产生的原因提供了新的思路和方向。

* * *

致谢:本实验受到四川大学华西医院内分泌科安振梅教授的指导,特此感谢。

参 考 文 献

- 1 Xu Y, Wang L, He J, *et al.* Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA*,2013;310(9):948-959.
- 2 Chen SC, Tseng CH. Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. *Rev Diabet Stud*, 2013;10(2-3):88-100.
- 3 Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells; identification of betacellulin as a novel β -cell mitogen. *Endocrinology*,1998;139(4):1494-1499.
- 4 Bao S, Song H, Tan M, *et al.* Group VIB Phospholipase A(2) promotes proliferation of INS-1 insulinoma cells and attenuates lipid peroxidation and apoptosis induced by inflammatory cytokines and oxidant agents. *Oxid Med Cell Longev*,2012; 2012;989372. doi: 10.1155/2012/989372.
- 5 郑宏庭, 邓华聪. 葡萄糖激酶与糖尿病的研究. *中国临床康复*,2004;8(27):5960-5961.
- 6 邵建东, 王广义, 刘铜军. C-Myc 和 VEGF 基因的小分子干扰 RNA 对人结直肠癌细胞的影响. *中华胃肠外科杂志*,2009;12(5):502-506.
- 7 Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells; identification of betacellulin as a novel β -cell mitogen. *Endocrinology*,1998;139(4):1494-1499.
- 8 杨立勇, 杨永年. 核转录因子 NF-KB 和 IL- β 及其他细胞因子介导的 INS-1 细胞损害中的作用. *中华内分泌代谢杂志*,2003; 19(3):235-237.
- 9 Quan X,Zhang L, Li Y, *et al.* TCF2 attenuates FFA-induced damage in islet β -cells by regulating production of insulin and ROS. *Int J Mol Sci*,2014;15(8):13317-13332.
- 10 Zhang SS, Hao E, Yu J, *et al.* Coordinated regulation by shp2 tyrosine phosphatase of signaling events controlling insulin biosynthesis in pancreatic β -cells. *PNAS*,2009;106(18):7531-7536.
- 11 Santini E, Fallahi P, Ferrari SM, *et al.* Effect of PPAR- γ activation and inhibition on glucose-stimulated insulin release in INS-1e cells. *Diabetes*,2004;53(Suppl 3):S79-S83.
- 12 Stephens LA, Thomas HE, Ming L, *et al.* Tumor necrosis factor- α -activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic β cells. *Endocrinology*,1999;140(7): 3219-3227.

- 13 Wei D, Li J, Shen M, *et al.* Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic β -cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokin-induced cell death. *Diabetes*,2010;59(2):471-478.
- 14 程 红. 黄酰脲药物受体基因多态性及其与 2 型糖尿病、黄酰脲药物疗效相关性研究进展. *中国医药工业杂志*,2006;37(1):54-57.
- 15 Lin Y, Sun X, Qiu L, *et al.* Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis*, 2013 Jan 17;4:e460. doi: 10.1038/cddis.2012.206.
- 16 Motoshige H, Oyama K, Takahashi K, *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in gemcitabine-induced apoptosis-like cell death in insulinoma cell line INS-1. *Biol Pharm Bull*,2012;35(11):1932-1940.
- 17 Ruszkowska-Ciastek B, Sokup A, Socha MW, *et al.* A preliminary evaluation of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Zhejiang Univ Sci B*,2014;15(6):575-581.
- 18 Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, *et al.* Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*,2010;24(11):755-762.

(2015-05-22 收稿,2015-09-18 修回)

编辑 沈 进

(上接第 22 页)

- 11 Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, *et al.* Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*,2009;16(6):510-520.
- 12 Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, *et al.* Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*,2010;328(5981):1031-1035.
- 13 Sharma A, Kapoor P, Gautam A, *et al.* Computational approach for designing tumor homing peptides. *Sci Rep*,2013;3:1607. doi: 10.1038/srep01607.
- 14 Zhu Z, Xie C, Liu Q, *et al.* The effect of hydrophilic chain length and iRGD on drug delivery from poly(ϵ -caprolactone)-poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles. *Biomaterials*,2011;32(35):9525-9535.
- 15 Puig-Saus C, Rojas LA, Laborda E, *et al.* iRGD tumor-penetrating peptide-modified oncolytic adenovirus shows enhanced tumor transduction, intratumoral dissemination and antitumor efficacy. *Gene Ther*,2014;21(8):767-774.
- 16 Cai H, Yang H, Xiang B, *et al.* Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides. *Mol Pharm*,2010;7(2):586-596.
- 17 Yang H, Liu S, Cai H, *et al.* Chondroitin sulfate as a molecular portal that preferentially mediates the apoptotic killing of tumor cells by penetratin-directed mitochondria-disrupting peptides. *J Biol Chem*,2010;285(33):25666-25676.
- 18 Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, *et al.* A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med*,2002;8(7):751-755.
- 19 Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, *et al.* Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004;101(25):9381-9386.
- 20 Alberici L, Roth L, Sugahara KN, *et al.* De novo design of a tumor-penetrating peptide. *Cancer Res*,2013;73(2):804-812.
- 21 Hu Q, Gu G, Liu Z, *et al.* F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*, 2013; 34(4):1135-1145.
- 22 Yang ZZ, Li JQ, Wang ZZ, *et al.* Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas. *Biomaterials*,2014;35(19):5226-5239.
- 23 He X, Na MH, Kim JS, *et al.* A novel peptide probe for imaging and targeted delivery of liposomal doxorubicin to lung tumor. *Mol Pharm*,2011;8(2):430-438.

(2015-04-13 收稿,2015-08-13 修回)

编辑 余 琳