

基于过表达 IRA、IRB 蛋白的 MDCK 细胞构建胰岛素受体结合能力体外检测模型

周小磊¹, 褚成龙², 赵天宇¹, 李珍珍¹, 王 泽^{1*}, 王晓良¹

1. 天津药物研究院有限公司 药物成药性评价与系统转化重点实验室, 天津 300301

2. 天津市第三中心医院, 天津 300170

摘要: **目的** 分别构建稳定过表达胰岛素受体 (IR) A、IRB 蛋白的犬肾细胞 MDCK, 用于胰岛素受体结合能力体外检测。**方法** 利用慢病毒感染法在 MDCK 细胞内分别稳定过表达 IRA、IRB 蛋白, 构建 MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞, 同时制备感染空白对照质粒的 MDCK-mock 细胞, Western blotting 检测 IR 蛋白表达, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 *IR*、*IRB* mRNA 水平。进行 ¹²⁵I 标记胰岛素 (1 nmol·L⁻¹) 与 MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞结合动力学实验, 筛选孵育温度、时间、细胞接种数; 以中国食品药品检定研究院 (中检院) 生物甘精胰岛素粉末与来得时公司生产的甘精胰岛素注射液作为胰岛素受试品, 进行与 ¹²⁵I 标记胰岛素的竞争结合实验。**结果** 与 MDCK-mock 细胞比较, MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞均高表达 IR 蛋白; MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞均检测出转录较高水平的 *IR* mRNA, 但 *IRB* 特异引物只能在 MDCK-IRB 细胞中检测到 *IRB* mRNA, 均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。2 种细胞模型具有胰岛素结合作用, MDCK-IRA 与胰岛素的结合能力强于 MDCK-IRB 细胞, ¹²⁵I 标记胰岛素与 MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞最佳孵育温度与时间为 4 °C 条件下孵育 10 h, 最适接种细胞数量为每孔 5×10^5 个细胞以内。不同浓度来得时和中检院甘精胰岛素对 ¹²⁵I 标记胰岛素与 IRA 结合活性抑制作用的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 3.698、5.829 nmol·L⁻¹, 对 ¹²⁵I 标记胰岛素与 IRB 结合活性抑制作用 IC₅₀ 值分别为 4.977、9.068 nmol·L⁻¹。**结论** 过表达 IRA、IRB 蛋白的 MDCK 细胞模型简便、功能稳定, 可用于体外检测胰岛素制剂与 IR 结合活性。

关键词: 胰岛素受体; MDCK-IRA; MDCK-IRB; 竞争结合实验; 甘精胰岛素

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)08-2247-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.018

Construction of MDCK cell models with overexpressed IRA and IRB proteins for *in vitro* detection of insulin receptor binding ability

ZHOU Xiaolei¹, CHU Chenglong², ZHAO Tianyu¹, LI Zhenzhen¹, WANG Ze¹, WANG Xiaoliang¹

1. Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Transformation, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Abstract: Objective To construct canine kidney cells MDCK stably overexpressing insulin receptor (IR) A and IRB proteins for *in vitro* detection of insulin receptor binding ability. **Methods** MDCK cells were stably overexpressed with IRA and IRB proteins by lentivirus infection to construct MDCK-IRA and MDCK-IRB cells, and MDCK-mock cells infected with blank control plasmid were prepared. Western blotting was used to detect IR protein expression, and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect *IR* and *IRB* mRNA levels. The binding kinetics experiments of ¹²⁵I-labeled insulin (1 nmol·L⁻¹) with MDCK-IRA and MDCK-IRB cells were conducted to screen the incubation temperature, time, and cell seeding number. The insulin products of biosimilar insulin glargine powder from the National Institute for Food and Drug Control and insulin glargine injection from Sanofi-Aventis were used as test samples for competitive binding experiments with ¹²⁵I-labeled insulin (1 nmol·L⁻¹). **Results** Compared with MDCK-mock cells, both MDCK-IRA and MDCK-IRB cells highly expressed IR protein. Both MDCK-IRA and MDCK-IRB cells showed high

收稿日期: 2024-12-26

基金项目: 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室项目 (712023001, 712023002, 712024001)

作者简介: 周小磊 (1995—), 女, 天津, 助理研究员, 硕士研究生, 从事细胞生物学与肿瘤药理研究。E-mail: zhouxiaolei@tipr.com.cn

*通信作者: 王 泽 (1994—), 男, 研究员, 博士研究生, 从事肿瘤药理、转运体与药理学研究。E-mail: wangze@tipr.com.cn

transcription levels of IR mRNA, but IRB-specific primers could only detect IRB mRNA in MDCK-IRB cells, which were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). The two cell models had similar insulin binding effects, but the binding ability of MDCK-IRA to insulin was slightly stronger than that of MDCK-IRB cells. The optimal incubation temperature and time for ^{125}I -labeled insulin with MDCK-IRA and MDCK-IRB cells were $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 h, and the optimal cell seeding number was less than 5×10^5 cells per well. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of different concentrations of biosimilar insulin glargine powder from the National Institute for Food and Drug Control and insulin glargine injection from Sanofi-Aventis on the binding activity of ^{125}I -labeled insulin to IRA were 3.698 and 5.829 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, and the IC_{50} values on the binding activity of ^{125}I -labeled insulin to IRB were 4.977 and 9.068 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The MDCK cell models overexpressing IRA and IRB proteins are simple and functionally stable, and can be used for in vitro detection of the binding activity of insulin preparations to IR.

Key words: insulin receptor; MDCK-IRA; MDCK-IRB; competition binding assay; insulin glargine

随着人民生活水平提高,中国已经成为全球糖尿病第一大国。胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素,1921年弗雷德里克·班丁与约翰·麦克劳德首次提取出了胰岛素,并于临床治疗中取得了显著效果,开启了糖尿病药物治疗新纪元^[1]。血液中葡萄糖含量高时,胰腺 β 细胞释放胰岛素,胰岛素与胰岛素受体(IR)结合激活胰岛素信号通路,在调控细胞生长、代谢稳态和神经元功能等过程中起关键作用^[2]。IR是一种具有酪氨酸激酶活性的单通道跨膜受体,广泛表达于人体各类细胞膜上,其中骨骼肌、肝脏及脂肪组织IR密度最高,是胰岛素调节机体代谢的三大主要靶器官^[3]。IR由位于19号染色体的INSR基因编码,编码区包含22个外显子,外显子11的选择性剪接产生2种结构不同的异构体:IRA和IRB^[4]。来自外显子11的12个氨基酸包含在IRB亚型(成熟亚型)中,但不包含在IRA亚型(胎儿亚型)中,2种亚型存在表达差异与功能差异^[5-6],IRA和IRB均与天然胰岛素结合,发挥胰岛素代谢调节功能。

100多年来,胰岛素的结构探索与合成工艺不断突破,在医疗与科研领域都取得了奇迹般的成果,经历了动物胰岛素、重组人胰岛素、胰岛素类似物的发展,胰岛素类似物作为三代胰岛素更适合人体生理需要。根据起效快慢、活性达峰时间及作用时间长短,可将胰岛素分为6大类:超短效胰岛素、短效胰岛素、中效胰岛素、长效胰岛素、超长效胰岛素以及预混胰岛素。三代胰岛素在市场上占比接近60%,在大中城市的三甲医院占据主流,80%~90%的新增糖尿病患者主要使用三代胰岛素,国内企业三代胰岛素产品市场占比较少,主要是甘精胰岛素,一种三代超长效胰岛素^[7]。面对市场上胰岛素类制剂产品日益多样化,胰岛素类产品的活性鉴定不可忽视。目前国际上针对人胰岛素及

类似物或偶联物的生物效价测定方法是动物体内法,在胰岛素的原料和制剂中尚无有效可靠的体外细胞模型来分析检测生物效价。

胰岛素类产品的生物学活性检定,应在根据《中国药典》胰岛素生物测定法研究的基础上,开展受体结合力、胰岛 β 细胞增殖、受体磷酸化、代谢功能(葡萄糖摄取、脂肪合成、糖原合成等)等体外活性研究。为了建立胰岛素制剂与IR体外结合能力检测的更为简便可靠的方案,本研究通过慢病毒感染法,在MDCK细胞中分别稳定过表达2种亚型的IR(IRA、IRB),作为体外检测细胞模型。并利用 ^{125}I 标记胰岛素通过饱和实验、竞争结合实验等,检验细胞模型与胰岛素对照品的结合能力。为了进一步验证此模型可靠性,本研究亦检测了国内已上市的甘精胰岛素产品与MDCK-IRA/MDCK-IRB的结合能力。旨在为胰岛素类制剂产品提供操作简便、性价比高、功能稳定的受体结合能力细胞检测模型,以及为IR相关课题提供更为简便、成本低、可重复性高的科研工具。

1 材料

1.1 细胞

犬肾细胞MDCK(NBL-2),武汉普诺赛生命科技有限公司;HEK-293T细胞,美国典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂

生物甘精胰岛素粉末,每支15 mg,货号140701,中国食品药品检定研究院(后简称中检院);甘精胰岛素注射液,每支300 IU、3 mL,来得时公司; ^{125}I 标记胰岛素,天津市协和医药科技集团有限公司。2种核心质粒IRA和IRB,以及空白对照质粒mock,云舟生物公司;3种包装质粒pMDLg-pRRE、pMD2.G-VSVG和pRSV-Rev,丰晖生物公司;Lipofectamine 3000转染试剂,Thermo

Fisher 公司; GAPDH 抗体 (货号 60004-1-Ig), Proteintech 公司; 重组 Anti-Insulin Receptor beta 抗体 (货号 ab227831), abcam 公司; TransZol Up Plus RNA Kit, 北京全式金生物技术有限公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit、荧光定量试剂盒 FastStart Universal SBRY Green Master (ROX) (04913914001), Roche 公司; 高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液, 索莱宝生物公司; 极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (BeyoECL Moon), 碧云天生物公司。

1.3 主要仪器

WIZARD2 2470 自动伽马计数器, 美国 Revvity 公司; Protein simple 超灵敏全自动成像分析仪, 美国 Bio-technie 公司。

2 方法

2.1 稳转细胞构建

于 3 个 6 cm 细胞培养皿中铺入一定量 HEK-293T 细胞, 使转天细胞汇合度达到 80% 左右; 铺板后 18~24 h, 利用 Lipofectamin 3000 转染试剂, 将 2 μg 的 2 种核心质粒 (IRA 和 IRB) 以及 mock, 分别与总量为 2 μg 的包装质粒 (pMDLg-pRRE : pMD2.G-VSVG : pRSV-Rev = 5 : 3 : 2) 于 HEK-293T 细胞中共转染; 转染后 48 h, 完成 3 种病毒颗粒 (分别含有 mock、IRA、IRB 基因) 的包装, 收取细胞上清液; 将一定量 MDCK 细胞铺入 6 孔板的 4 个孔中, 使转天细胞汇合度为 40% 左右, 将分别包含 mock、IRA、IRB 基因的 3 种病毒的细胞上清液加入到 6 孔板的 3 个孔中, 进行慢病毒感染, 另一孔作为阴性对照; 感染后 48 h, 更换含有 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素的培养基筛选稳转细胞系, 稳定传代 1 周后进行核酸蛋白水平验证。

2.2 Western blotting 检测 IR 蛋白表达

利用高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液裂解 MDCK-mock、MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞, 提取全细胞裂解液, 选择 8% 蛋白胶进行蛋白分离, 经过电泳、转膜、封闭、抗体孵育等操作后, 利用极超敏 ECL 化学发光试剂盒进行显色。

2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

利用 TransZol Up Plus RNA Kit 分别提取 MDCK-mock、MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞的总 RNA, 之后利用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit 将总 RNA 样品中的 mRNA 反转录为 cDNA, 并以此 cDNA 为模板, 利用 FastStart

Universal SBRY Green Master (ROX) 进行 qPCR。引物序列如下: GAPDH-F: 5'-GTGAAGGTCGG AGTCAACGG-3', GAPDH-R: 5'-TCAATGAAGG GGTTCATTGATGG-3'^[8]; IRA/IRB 通用引物: IR-1-F: 5'-ATATCCGGAACAACCTC-3', IR-1-R: 5'-GTCCT TCAGGCTCTCG-3'; IRB 特异引物: IR-2-F: 5'-ACCTCTTCAGGCACTG-3', IR-2-R: 5'-CAAGCC GGAGATGACC-3'。

2.4 胰岛素结合动力学

2.4.1 孵育温度与时间筛选 分别将 MDCK-mock、MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞铺入 24 孔板, 每孔 2.5×10^5 个。转天细胞长满, 以 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、1% 牛血清白蛋白 (BSA) 缓冲液溶解 ^{125}I 标记胰岛素粉末, 配制为终浓度为 1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的给药缓冲液。3 种细胞各设 2 种温度 (4、24 $^{\circ}\text{C}$) 以及 6 个时间点 (4 $^{\circ}\text{C}$: 0.5、1.0、2.0、6.0、12.0、24.0 h, 24 $^{\circ}\text{C}$: 10、20、30、60、120、240 min), 每个时间点 3 个复孔, 去掉培养基, 每孔加入 250 μL ^{125}I 标记胰岛素给药缓冲液。孵育完毕后, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 清洗 3 遍, 每孔添加 500 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 裂解细胞, 将裂解液分别转移至检测管中, 用自动伽马计数器测定样品中的放射强度 (cpm 值)。

2.4.2 孵育细胞数筛选 3 种细胞分别设置 6 种细胞浓度 (每孔 5×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 个), 每种浓度 3 个复孔, 各加入 250 μL ^{125}I 标记胰岛素 (1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 10 h。孵育完毕后, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 清洗 3 遍, 每孔添加 500 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 裂解细胞, 将裂解液分别转移至检测管中, 用自动伽马计数器测定样品中的放射强度。

2.5 竞争结合实验

分别将 MDCK-mock、MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞铺入 24 孔板, 每孔铺入 2.5×10^5 个。第 2 天细胞长满, 将中检院生物甘精胰岛素粉末与来得时公司生产的甘精胰岛素注射液作为胰岛素受试品, 先利用 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液 (pH 值为 3), 分别将 2 种胰岛素受试品配制成 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。再以 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、1% BSA 缓冲液溶解 ^{125}I 标记胰岛素粉末, 作为给药缓冲液, 将上述受试品储备液分别稀释成 12 种给药浓度 (0.001、0.003、0.010、0.030、0.100、0.300、1.000、3.000、10.000、30.000、100.000、300.000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对照组不加药。给药时移去培养板内培养液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的磷

酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次, 每孔加入 250 μL 给药液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 10 h。50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 清洗 3 遍, 每孔添加 500 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 裂解细胞, 将裂解液分别转移至检测管中, 用自动伽马计数器测定样品中的放射强度。计算各组的相对放射强度。

相对放射强度 = (MDCK-IRA/MDCK-IRB 受试品放射强度 - MDCK-mock 受试品放射强度) / (对照组 MDCK-IRA/MDCK-IRB 放射强度 - 对照组 MDCK-mock 放射强度)

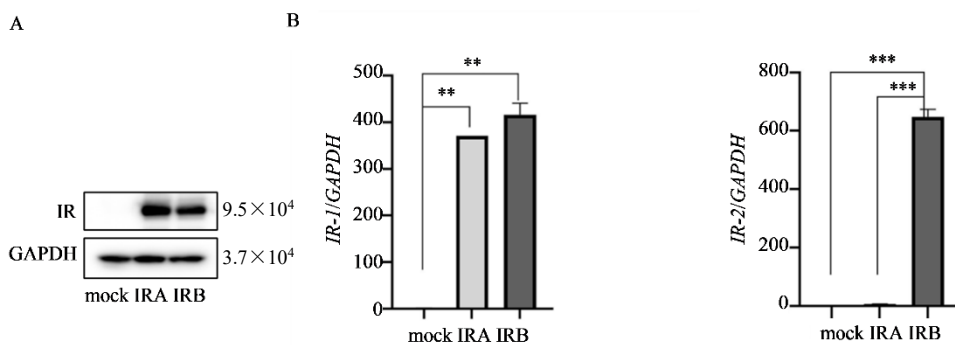
2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据均采用 GraphPad Prism (version 8.0.0) 进行统计分析, 各组实验指标均采用随机设计的单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 稳转细胞系构建

Western blotting 结果显示, MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞均高表达 IR 蛋白 (图 1-A)。由于外显子选择性剪切, IRB 比 IRA 多包含 12 个氨基酸, 在这多出的 12 个氨基酸处设计 IRB 特异引物 (IR-2), 12 个氨基酸以外设计 IRA/IRB 通用引物 (IR-1), 用以区分 2 种亚型基因。qRT-PCR 结果显示 (图 1-B), 利用 IRA/IRB 通用引物 (IR-1), MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞均检测出转录较高水平的 IR mRNA, 但 IRB 特异引物 (IR-2) 只能在 MDCK-IRB 细胞中检测到 mRNA, 与 mock 组比较, 均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。



A-Western blotting 检测 IR 蛋白的表达情况; B-qRT-PCR 检测 IR-1、IR-2 mRNA 水平; 与 mock 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
A-Expression of IR protein detected by Western blotting; B-IR-1 and IR-2 mRNA expression detected by qRT-PCR; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs mock group.

图 1 MDCK-IRA、MDCK-IRB 细胞的构建 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 1 Construction of MDCK-IRA and MDCK-IRB cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 胰岛素结合动力学

饱和和实验验证 2 种细胞模型与胰岛素的结合动力学, 如图 2 所示, 在所用 ^{125}I 标记胰岛素浓度下, 相比于在 24 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育, MDCK-IRA (图 2-A) 与 MDCK-IRB (图 2-B) 细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育与胰岛素的结合摄取放射强度更高, 效率更高。MDCK-IRA 细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 h 后摄取达到饱和, MDCK-IRB 细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 h 后摄取达到饱和。

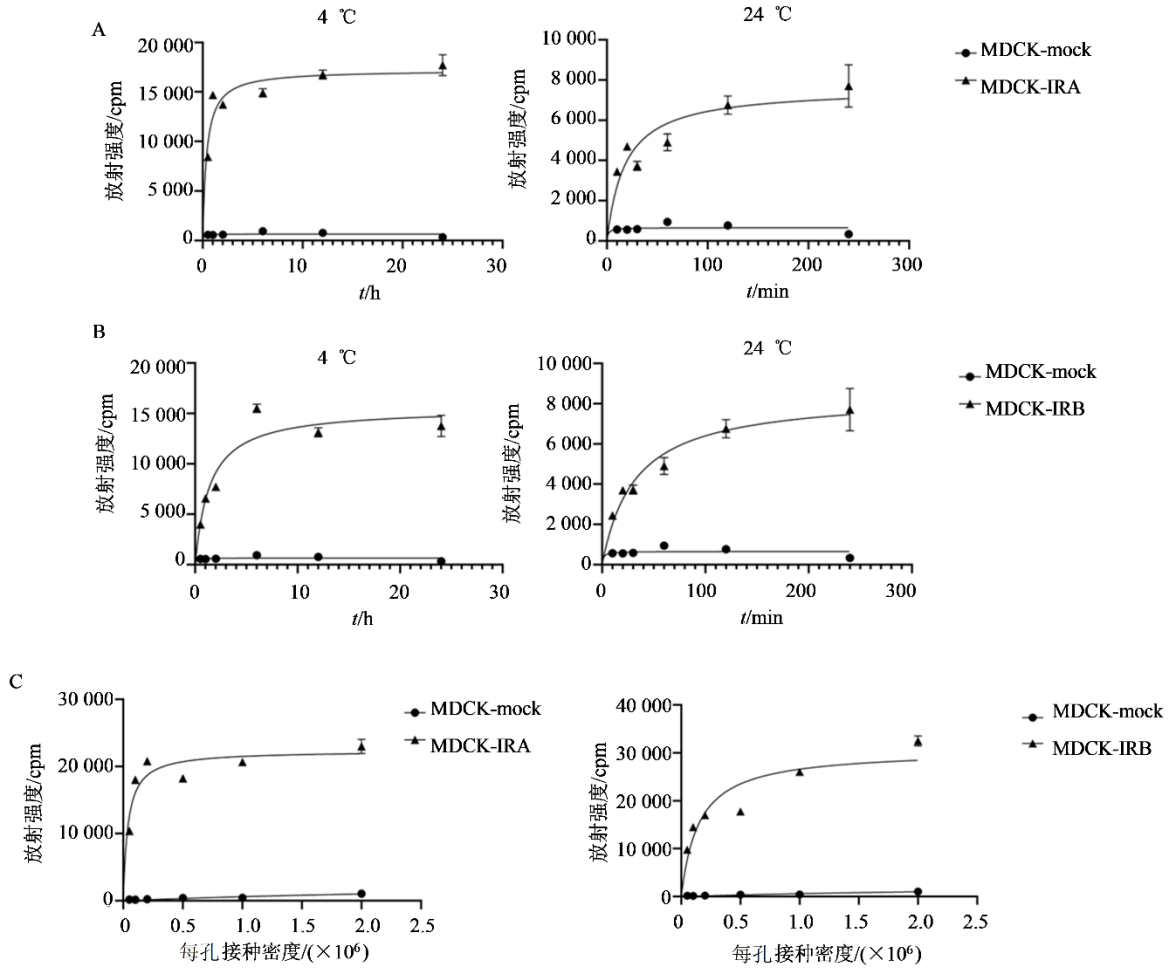
细胞量饱和实验结果显示 (图-C), $(2\sim 5) \times 10^5$ 个 MDCK-IRA 细胞, 与所试 ^{125}I 标记胰岛素结合趋近饱和, 而 1×10^6 个 MDCK-IRB 细胞才与所试 ^{125}I 标记胰岛素结合趋近饱和。且 MDCK-IRA 细胞数量未达到饱和时的放射强度值, 高于相应细胞数量的 MDCK-IRB。因此可得出, 2 种细胞模型胰岛素均可与 IR 结合, 且 IRA 与胰岛素的结合能力强于 IRB。

3.3 胰岛素制剂产品与 ^{125}I 标记胰岛素竞争结合

随着胰岛素制剂浓度增高, 抑制 ^{125}I 标记胰岛素与 IR 结合程度越强, 则检测到的细胞放射性越弱。如图 3 所示, 不同浓度来得时和中检院甘精胰岛素对 ^{125}I 标记胰岛素与 IRA 结合活性抑制作用的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 3.698、5.829 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 来得时和中检院甘精胰岛素对 ^{125}I 标记胰岛素与 IRB 结合活性抑制作用 IC_{50} 值分别为 4.977、9.068 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞模型在 IR 蛋白质表达水平以及 mRNA 转录水平相比于 MDCK-mock 细胞均有显著提升。基于胰岛素结合动力学的结果, MDCK-IRA 与 MDCK-IRB 细胞模型同时进行胰岛素与受体结合能力检测时, 最佳孵育温度与时间为 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 h, 最适的实验细胞数量为 5×10^5 个细胞以内。2 种 IR 与胰岛素有相似结



A-MDCK-IRA 细胞分别在 4、24 °C 条件下孵育, ¹²⁵I 标记胰岛素与受体结合的时间进程; B-MDCK-IRB 细胞分别在 4、24 °C 条件下孵育, ¹²⁵I 标记胰岛素与受体结合的时间进程; C-不同细胞数量下, 2 种细胞模型与 ¹²⁵I 标记胰岛素的结合的荧光强度。

A-MDCK-IRA cells were incubated at 4 and 24 °C, respectively, to investigate the time course of ¹²⁵I labeled insulin receptor binding; B-MDCK-IRB cells were incubated at 4 and 24 °C, respectively, and the time course of ¹²⁵I labeled insulin receptor binding was observed; C-Fluorescence intensity of binding between two cell models and ¹²⁵I labeled insulin under different cell numbers.

图 2 胰岛素与受体结合动力学 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Kinetics of insulin binding to receptors ($\bar{x} \pm s, n=3$)

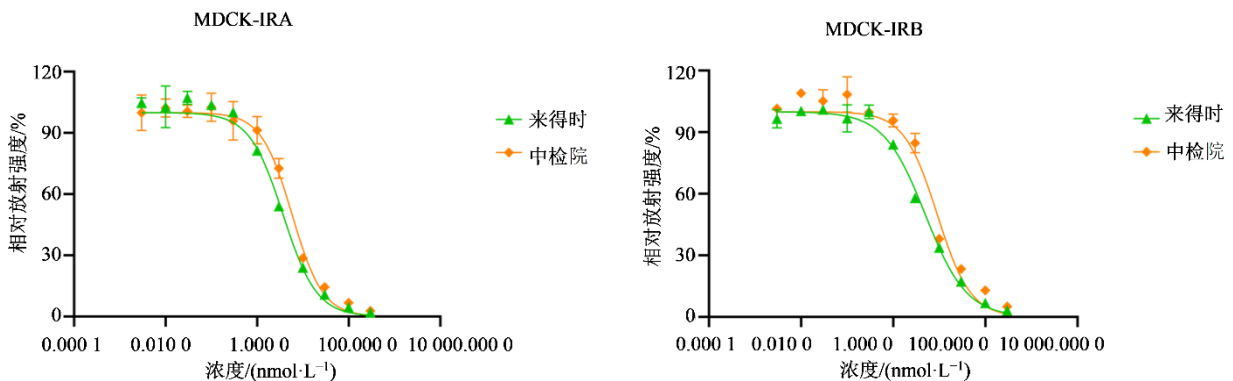


图 3 不同胰岛素制剂对 IRA、IRB 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Inhibitory effects of different insulins on IRA and IRB ($\bar{x} \pm s, n=3$)

合能力,但 MDCK-IRA 的结合力强于 MDCK-IRB。在最佳孵育温度、孵育时间以及合适的细胞数量范围内进行竞争结合实验,即在 24 孔板内铺入 2.5×10^5 个细胞,转天在 ^{125}I 标记胰岛素缓冲液中、 4°C 条件下孵育 10 h。

然而,导致 MDCK-IRA 和 MDCK-IRB 对胰岛素结合活性存在差异的原因,仍需要进一步探索。已有研究表明,IRA 对胰岛素样生长因子 II (IGF-II) 的结合力明显高于 IR-B。IGF-II 与胰岛素同源,在大多数细胞中作为主要的生长因子^[9-10],这类研究成果可为进一步探索 MDCK-IRA 和 MDCK-IRB 对胰岛素的结合差异提供方向。IRA 主要表达于胚胎和胎儿组织、中枢神经系统 (CNS)、造血细胞和癌细胞,而 IRB 主要表达于胰岛素的主要靶组织,如肝脏、脂肪和肌肉。当被胰岛素激活时,IRB 主要介导代谢作用,而被激活的 IRA 则比 IR-B 更能介导有丝分裂作用^[11]。大量研究表明,IRA 也于胚胎和恶性肿瘤组织中显著表达,与 IGFs 结合介导有丝分裂效应,调控肿瘤细胞增殖^[12]。MDCK-IRA 和 MDCK-IRB 模型的建立,也可作为肿瘤研究相关课题提供新的实验思路。

随着现代科学技术的发展,胰岛素也多种多样,但胰岛素制剂的研发依旧存在很多进步空间,因此制定标准化体外检测方案亦十分重要。目前国际上针对人胰岛素及类似物或偶联物的生物效价测定方法是动物体内法,尚无有效可靠的体外细胞模型进行检测。除此之外,科研中常用于 IR 相关实验的受体样本,大多数为纯化蛋白或新鲜制备的组织细胞膜,不仅增加了实验成本与操作步骤,受体样本的稳定性也难以控制。

本实验通过构建 2 种分别表达 IRA、IRB 蛋白的工程细胞株 MDCK-IRA、MDCK-IRB,利用 ^{125}I 标记胰岛素饱和实验与竞争结合实验,检测这 2 种细胞模型与胰岛素的结合能力,检测结果均符合已报道的结合规律^[1,4,6]。以此细胞模型进行试验,操作简单、成本低、重复性高,为体外 IR 结合能力检测提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Choi E, Bai X C. The activation mechanism of the insulin receptor: A structural perspective [J]. *Annu Rev Biochem*, 2023, 92: 247-272.
- [2] Malakar P, Chartarifsy L, Hija A, et al. Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31222.
- [3] Payankulam S, Raicu A M, Arnosti D N. Transcriptional regulation of INSR, the insulin receptor gene [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(12): 984.
- [4] Vella V, Milluzzo A, Scalisi N M, et al. Insulin receptor isoforms in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): E3615.
- [5] Hall C, Choi E. New scavenger to fine-tune insulin action in β cells [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(4): 707-708.
- [6] Haeusler R A, McGraw T E, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(1): 31-44.
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 1 型糖尿病胰岛素治疗指南 [J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2017, 24(8): 40-44. Diabetes Branch of Chinese Medical Association. China guidelines for insulin treatment of type 1 diabetes mellitus [J]. *Chin Pract J Rural Dr*, 2017, 24(8): 40-44.
- [8] Saengchoowong S, Khongnomnan K, Poomipak W, et al. High-throughput microRNA profiles of permissive madin-darby canine kidney cell line infected with influenza B viruses [J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 986.
- [9] Werner H, Laron Z. Role of the GH-IGF1 system in progression of cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 518: 111003.
- [10] Frasca F, Pandini G, Sciacca L, et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2008, 114(1): 23-37.
- [11] Westermeier F, Sáez T, Arroyo P, et al. Insulin receptor isoforms: An integrated view focused on gestational diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32(4): 350-365.
- [12] An W D, Hall C, Li J, et al. Activation of the insulin receptor by insulin-like growth factor 2 [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2609.

[责任编辑 兰新新]