

· 博士之窗 ·

平糖方药物血清改善 INS-1 胰腺 β 细胞脂性凋亡的作用研究张海啸^{1,2} 杨叔禹¹ 曹洪欣² 鞠大宏² 潘静华² 李玉梅² 张立石²

摘要 目的 观察平糖方药物血清对 INS-1 胰腺 β 细胞脂性凋亡的改善作用及机制。方法 以软脂酸 (palmitic acid, PA) 诱导 INS-1 胰腺 β 细胞脂性凋亡, 采用平糖方药物血清干预。实验分为 5 组, 即大鼠血清对照 (RS) 组、大鼠血清加 PA (PA) 组、平糖方低剂量药物血清加 PA (PTR L) 组、平糖方中剂量药物血清加 PA (PTR M) 组、平糖方高剂量药物血清加 PA (PTR H) 组, 每组 6 个复孔。通过 TUNEL 法检测细胞凋亡, 化学发光法检测 Caspase-3 活性, DCHF-DA 掺入法检测细胞内 ROS 生成的变化, RT-PCR 方法检测解偶联蛋白-2 (UCP-2) 的表达。结果 PA 组比 RS 组的凋亡细胞增多 ($P < 0.01$), PTR 各组的凋亡细胞同 PA 组比较有降低的趋势。PA 组 INS-1 胰腺 β 细胞 Caspase-3 酶活性增强, PTR M 组同 PA 组比较 Caspase-3 酶活性降低 ($P < 0.05$)。PTR L、M 组可抑制由 PA 引起的细胞内 ROS 产生增多, 与 PA 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。平糖方各组的 UCP-2 mRNA 表达量均较 PA 组降低 (其中 PTR L 1.286 ± 0.373 , $P < 0.01$; PTR M 1.627 ± 0.348 , $P < 0.05$)。结论 平糖方药物血清对 INS-1 β 细胞脂性凋亡有一定的保护作用, 并可能通过调节 ROS、UCP-2 发挥作用。

关键词 平糖方; 药物血清; INS-1 胰腺 β 细胞; 脂性凋亡; 活性氧; 解偶联蛋白-2

Effect of Pingtang Recipe Containing Drug-Serum on INS-1 Pancreatic β Cells Lipoapoptosis ZHANG Hai-xiao, YANG Shu-yu, CAO Hong-xin, et al *First Hospital of Xiamen, Fujian University of Medicine, Xiamen, Fujian province (361003)*

ABSTRACT Objective To observe the effect and mechanism of Pingtang Recipe containing drug-serum (DS-PTR) in improving INS-1 β pancreatic cells lipoapoptosis. Methods Experimental INS-1 β cells were divided into 5 groups (6 pools for each group), namely, the blank control group treated with rat's serum (C), the other 4 model groups induced into lipoapoptosis by palmitic acid and treated respectively by rat's serum (M), high, middle and low dose DS-PTR (DSh, DS_M and DSI). Cell apoptosis was detected by TUNEL staining; Caspase-3 activity of cells was measured by chemiluminescence method; intracellular production of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCHF-DA incorporation, and expressions of uncoupling protein-2 (UCP-2) was determined by RT-PCR. Results INS-1 β cell apoptosis in Group M was significantly higher than that in Group C ($P < 0.01$), while that showed a decreased trend in the three DS-PTR treated groups. Caspase-3 activity was enhanced in Group M, it decreased significantly in Group DS_M ($P < 0.05$). The over-produced ROS in cells after modeling was inhibited in Groups DS_M and DSI ($P < 0.05$), meantime, expression of UCP-2 excited by PA (2.244 ± 0.421) was reduced significantly in Group DSI and Group DS_M to 1.286 ± 0.373 ($P < 0.01$) and 1.627 ± 0.348 ($P < 0.05$) respectively. Conclusion DS-PTR shows a protective effect on INS-1 β pancreatic cells against lipoapoptosis, which is possibly play its mechanism through regulating ROS and UCP-2.

KEYWORDS Pingtang Recipe; drug-serum; INS-1 β pancreatic cells; lipoapoptosis; reactive oxygen species; uncoupling protein-2

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (No. 20090450832); 福建省自然科学基金、国家自然科学基金资助项目 (No. 30973912)

作者单位: 1. 福建医科大学附属厦门第一医院 (福建厦门 361003); 2. 中国中医科学院 (北京 100700)

通讯作者: 杨叔禹, Tel: 0592-2137558, E-mail: yang.shuyu@yahoo.com.cn

肥胖是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的易患因素, 肥胖和 2 型糖尿病常伴随游离脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 升高。FFAs 升高与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和 β 细胞功能损伤均有密切关系。长链的游离脂肪酸, 对胰岛 β 细胞有多种影响, 短期刺激可增加葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS), 长期作用可导致 β 细胞功能障碍、抑制胰岛素分泌并诱导 β 细胞凋亡^[1]。本研究主要探讨中药平糖方药物血清对 INS-1 胰腺 β 细胞脂性凋亡的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞 INS-1 胰腺 β 细胞株, 中日友好医院内分泌代谢病研究中心李光伟教授惠赠。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 20 只, 动物平均体重 (252.7 ± 11.3) g, 购自北京维通利华实验动物中心, 动物合格证号: SCXK (京) 2002-0003。清洁级动物房, 温度为 (22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50% ~ 60%, 12/12 h 明暗周期, 自由进食饮水。

1.3 药物 平糖方由白术、泽泻、山楂、大黄组成, 购自厦门市药材公司, 经醇提 2 次、水提 2 次制成浸膏粉, 每 100 g 生药制成粉剂 20.23 g, 由厦门市第一医院药剂科提供。

1.4 试剂及仪器 TUNEL 试剂盒: 罗氏公司产品; Caspase-3 抗体: Santa Cruz 公司产品; Caspase-3 活性检测试剂盒: 美国 Promega 公司产品; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒, 碧云天公司产品; Trizol 试剂, invitrogen 公司产品; 逆转录试剂盒, Promega 公司产品; SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒: Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 药物血清制备 实验动物常规条件饲养, 适应性喂养 3 天后开始灌胃给药, 连续给药 7 天, 每天 1 次。于第 7 天给药后 1 h 腹主动脉无菌采血, 静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 经 56°C 、30 min 灭活处理后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置 -20°C 保存备用。平糖方的药物剂量按照人鼠剂量换算公式计算^[2], 低、中、高剂量分别设置为 0.28、1.4、7 g/kg, 大鼠血清对照组给予等量的蒸馏水灌胃。药物血清分组标记为: 大鼠血清对照组、平糖方低、中、高剂量组。

2.2 细胞培养^[3] INS-1 细胞常规用含 10% FBS 的 PRMI-1640 培养基 (包含青霉素 100 U/mL, 链霉素

100 $\mu\text{g/mL}$, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 50 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇) 培养。将处于对数生长期的 INS-1 细胞用 0.25% 的胰酶消化成单细胞悬液, 按一定浓度接种于细胞培养皿, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。实验分为 5 组, 即大鼠血清对照 (RS) 组、大鼠对照血清加 PA (PA) 组、平糖方低剂量药物血清加 PA (PTR L) 组、平糖方中剂量药物血清加 PA (PTR M) 组、平糖方高剂量药物血清加 PA (PTR H) 组, 每组 6 个复孔。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 细胞按 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔细胞培养板上, 培养 24 h; 换含大鼠血清或药物血清的培养基, 并加入软脂酸 (palmitic acid, PA) 使终浓度达到 0.5 mmol/L, 继续培养 72 h; 4% 多聚甲醛固定细胞; 含 3% H_2O_2 的甲醇溶液孵育 10 min; PBS 漂洗后用含 0.1% Triton X-100 的 0.1% 柠檬酸钠透化细胞 2 min; 加 50 mL TUNEL 反应混合液至玻片, 放入湿盒中 37°C 避光孵育 60 min; 加 50 mL Converter-POD, 37°C 湿箱孵育 30 min; 用 PBS 漂洗后加 50 mL DAB 基质, 室温孵育 10 min; 流水冲洗后甘油封片并在光学显微镜下观察并分析。

2.4 Caspase-3 活性检测^[4] 将消化成单细胞悬液的 INS-1 细胞以每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔板, 培养 24 h; 换含大鼠血清或药物血清的培养基, 并加入 PA 使终浓度达到 0.5 mmol/L, 继续培养 72 h 后弃去培养液, 终止培养; PBS 洗 3 遍, 加入 Caspase-3 反应液加 100 μL 于 96 孔板内, 室温孵育 2 h; 于 Top-Count 实验室自动化工作站检测化学发光值。

2.5 DCFH-DA 掺入法测定细胞内生 ROS^[5] 细胞按 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔细胞培养板上, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后换含大鼠血清或药物血清的培养基, 并加入 PA 使终浓度达到 0.5 mmol/L, 继续培养 72 h; 用无血清培养液清洗细胞; 按照 1:1 000 用无血清培养液稀释荧光染料 DCFH-DA, 使终浓度为 10 mmol/L; 去除细胞培养液; 加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA, 37°C 细胞培养箱内孵育 30 min; 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA; 消化并收集细胞, 使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 于流式细胞仪检测荧光的强弱。

2.6 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 UCP-2 mRNA 含量 按 Trizol 法常规进行细胞内总 RNA 提取, 按逆转录试剂盒操作步骤合成 cDNA。实时荧光定量反应条件: 95°C 60 s, 1 个循环; 95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 45 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算基

因表达情况。引物序列如下:UCP-2 上游引物 AA-GACCATTCACACGAGAGGAA, 下游引物 AGGTCAC-CAGCTCAGTACAGTTGA; β -Actin 上游引物 GGAGAT-TACTG CCCTGGCTCCTA, 下游引物 GACTCATCG-TACTCCTGCTTGCTG。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行实验数据处理, 参数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 平糖方药物血清对细胞凋亡的影响(图 1)

TUNEL 染色阳性细胞为棕黄色, 阴性对照组未见棕黄色颗粒, RS 组可见到少数的阳性细胞, PA 长期刺激可以导致 TUNEL 阳性染色细胞增多, 而 PTRM 组的棕黄色染色减少。经过凋亡细胞百分率分析, 可见 PA 组比 RS 组的凋亡细胞明显增多(RS: 12.7 ± 5.0 , PA: 29.7 ± 7.8 , $P < 0.01$), PTF M 组的凋亡细胞(23.7 ± 6.3)同 PA 组比较有降低的趋势。

2 各组 Caspase-3 活性、ROS 产生、UCP-2 mRNA 表达的影响(表 1) 经 0.5 mmol/L PA 长时间(72 h)作用于 INS-1 β 细胞导致 Caspase-3 酶活性增强、细胞内 ROS 产生量增高、UCP-2 mRNA 表达量比 RS 组上调。PTR L、PTRM 组各指标均低于 PA 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组 ROS、Caspase-3、UCP-2 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS (荧光值)	Caspase-3 (化学发光值)	UCP-2 (mRNA 合成量)
RS	6	2.03 ± 0.04	31789.67 ± 5585.25	1.02 ± 0.11
PA	6	$2.17 \pm 0.10^*$	$42205.33 \pm 2138.26^*$	$2.24 \pm 0.42^*$
PTR L	6	$2.08 \pm 0.11^\Delta$	$40068.33 \pm 3255.04^\Delta$	$1.29 \pm 0.37^\Delta\Delta$
PTR M	6	$2.06 \pm 0.09^\Delta$	$34604.50 \pm 5013.57^\Delta$	$1.63 \pm 0.35^\Delta$
PTR H	6	2.19 ± 0.15	39002.83 ± 5661.27	1.86 ± 0.45

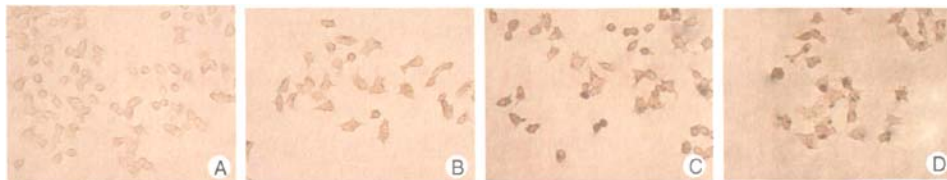
注: 与 RS 组比较, $^*P < 0.05$; 与 PA 组比较, $^\Delta P < 0.05$, $^\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

FFAs 能增强基础状态和葡萄糖刺激后的胰岛素分泌量, 并且是胰岛 β 细胞刺激-分泌耦联的必须物质。血 FFAs 水平的增高, 只要超过脂肪组织的存储能力, 就可抑制由胰岛素刺激所致周围组织对葡萄糖的摄取, 造成外周胰岛素抵抗, 有遗传易感性的个体更容易发展为 2 型糖尿病^[6]。并且, 长期的高浓度的 FFAs 可导致胰岛 β 细胞分泌功能降低, β 细胞凋亡增加, 降低血浆中 FFAs 浓度能改善胰岛素分泌^[1]。2001 年美国糖尿病学会(ADA)年会上 McGarry 教授首次提出可将 2 型糖尿病称作“糖脂病”(diabetes mellipitus)^[1]。越来越多的研究也证实胰岛 β 细胞的糖毒性和脂毒性在糖尿病的发病过程中起着同样的作用^[7,8]。

本研究通过 TUNEL 方法论证了 PA 可以导致 INS-1 β 细胞的脂性凋亡, 平糖方对 INS-1 β 细胞的脂性凋亡有一定的保护作用。Caspase 通路在细胞凋亡中发挥重要作用, 有研究显示上游 Caspase-3 抑制剂可阻断 FFA 诱导的 β 细胞凋亡^[8], 说明 FFA 可通过活化 Caspase 蛋白酶介导 β 细胞凋亡。平糖方可以降低 Caspase-3 酶的活性, 验证了平糖方的抗脂性凋亡作用。

然而, 平糖方通过何种机制改善脂性凋亡呢? 研究显示, 线粒体氧化应激途径在 β 细胞脂性凋亡过程中发挥着重要的作用^[9-12]。由于胰岛 β 细胞内自由基清除酶(超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等)和 ROS 清除蛋白如硫氧化还原蛋白的水平较低^[9], 对 ROS 比较敏感。因此氧化应激容易损伤胰岛 β 细胞线粒体, 导致胰岛素 mRNA 表达水平下降, 胰岛 β 细胞分泌胰岛素水平降低, 细胞凋亡增加^[10]。UCP-2 是线粒体的功能蛋白之一, 具有解耦联活性, 可以调节线粒体内膜上的质子跨膜转运, 进一



注: A 为阴性对照染色; B 为 RS 组; C 为 PA 组; D 为 PTRM 组

图 1 各组 TUNEL 法染色的凋亡细胞(200 $\times$)

步影响 ROS 生成,在线粒体氧化磷酸化解偶联过程中发挥着重要的作用^[11],外源性的 H_2O_2 诱导 β 细胞的 UCP-2 表达、抑制胰岛素分泌,提示氧自由基可能涉及到了 UCP-2 激活的机制^[12]。本研究显示,PA 长期作用可以诱导 ROS 产生增多,UCP-2 表达增加,提示 PA 能激活线粒体氧化应激,在 β 细胞脂性凋亡中发挥着一定的作用,平糖方低、中剂量组可抑制 PA 诱导的 ROS 产生增多和 UCP-2 表达增加,提示 ROS、UCP-2 是平糖方改善 β 细胞脂性凋亡的途径之一。

杨叔禹教授根据多年临床经验创立了平糖方,该方具有健脾益气、清化痰浊、活血化瘀的作用,本方主要由《金匱要略》中的泽泻汤加大黄、山楂而来,泽泻汤中泽泻、白术健脾渗湿、升清降浊,以除体内痰湿壅滞;加大黄以泻浊毒、除壅热,山楂消积、导滞、化瘀,诸药合而具健脾渗湿,化浊通瘀的功效。临床主要应用于痰湿血瘀型肥胖、代谢综合征或糖尿病患者,可改善患者的血糖、血脂状况。现代药理研究表明本方中的泽泻具有降血压、降血糖、抗脂肪肝、降血脂及抗动脉粥样硬化等作用^[13];白术具有利尿、降血糖、增强免疫力、抗肿瘤、抗衰老等作用^[14];而山楂^[15]和大黄^[16]的有效成分具有降血脂、抗氧化等作用,能针对高脂导致的 β 细胞受损的部分机制。

总之,本研究观察到平糖方药物血清可以改善 PA 造成的 INS-1 胰腺 β 细胞脂性凋亡,ROS、UCP-2 是平糖方改善 β 细胞脂性凋亡的途径之一。

参 考 文 献

- [1] McGarry JD. Banting Lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002, 51(1): 7-18.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005: 202-204.
Xu SY, Bian RL, Chen X, editors. Experimental methods of pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 202-204.
- [3] Hou ZQ, Li HL, Li GW, et al. Involvement of chronic stresses in rat islet and INS-1 cell glucotoxicity induced by intermittent high glucose [J]. Mol Cell Endocrinol, 2008, 291(1-2): 71-78.
- [4] Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. Nature, 1995, 376(6535): 17-18.
- [5] Zhang GG, Bai YP, Chen MF, et al. Asymmetric dimethylarginine induces TNF- α production via ROS/NF-K κ B dependent pathway in human monocytic cells and the inhibitory effect of reinoside C [J]. Vascular Pharmacol, 2008(2-3), 48: 115-121.
- [6] Marc P, Christopher J. Islet β cell failure in type 2 diabetes [J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1802-1812.
- [7] Piro S, Anello M, Di Pietro C, et al. Chronic exposure to free fatty acid or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress [J]. Metabolism, 2002, 51(10): 1340-1347.
- [8] Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. Diabetes, 2002, 51(5): 1437-1442.
- [9] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes [J]. Endocr Rev, 2002, 23(5): 599-622.
- [10] Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, et al. Prevention of glucose toxicity in HIT2T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants [J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(19): 10857-10862.
- [11] Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets *in vitro* [J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3422-3428.
- [12] Li LX, Skorpén F, Egeberg K, et al. Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal β -cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(1): 273-277.
- [13] 杨新波,黄正明,曹文斌,等. 泽泻提取物对正常及四氧嘧啶小鼠糖尿病模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(3): 24-26.
Yang XB, Huang ZM, Cao WB, et al. Effect of extract from *Rhizoma Alismatis* on normal and alloxan model in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2002, 8(3): 24-26.
- [14] 单俊杰,田庚元. 白术糖复合物 AMP-B 的理化性质及降血糖活性的研究[J]. 药学报, 2003, 38(6): 438-441.
Shan JJ, Tian GY. Studies on physico-chemical properties and hypoglycemic activity of complex polysaccharide AMP-B from *Atractylodes macrocephala* Koid [J]. Acta Pharm Sin, 2003, 38(6): 438-441.
- [15] 李贵海,孙敬勇,张希林,等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. 中草药, 2002, 3(1): 50-52.
Li GH, Sun JY, Zhang XL, et al. Experimental studies on antihyperlipidemia effects of two compositions from Hawthorn in mice [J]. Chin Tradit Herbal Drug, 2002, 3(1): 50-52.
- [16] Abe I, Seki T, Noguchi H, et al. Galloyl esters from rhubarb are potent inhibitors of squalene epoxidase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis [J]. Plant Med, 2000, 66(8): 753-754.

(收稿:2009-11-27 修回:2010-6-10)