

氧化应激与 β 细胞脂性凋亡关系及机制研究

楼大钧,李宏亮,杨文英,萧建中,杜瑞琴,王冰,白秀平,潘琳

(卫生部中日友好医院内分泌科,北京 100029)

[摘要] **目的:**观察长期高脂饮食对大鼠胰岛 β 细胞凋亡影响,探讨氧化应激相关因子及基因表达与 β 细胞脂性凋亡关系及可能机制。**方法:**41只SD雄性大鼠随机分为高脂饲料喂养的肥胖组($n=21$)和普通饲料喂养的正常对照组($n=20$),喂养28周后,检测血浆及胰腺组织中的丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)浓度;静脉葡萄糖耐量试验评价早相胰岛素分泌反应(AIR);TUNEL法观察胰岛 β 细胞凋亡情况并计数每个胰岛中 β 细胞凋亡率;采用荧光定量PCR(Real-time PCR)比较两组大鼠胰岛细胞解偶联蛋白-2(UCP-2)mRNA表达的情况。**结果:**28周时高脂饲养组血浆及胰腺组织中MDA高于正常饲养组($P<0.05$),而高脂饲养组血浆及胰腺组织中GSH低于正常饲养组($P<0.01$)。与基础值比较,高脂饲养组糖负荷后胰岛素增高的幅度低于正常饲养组(3.0倍vs 5.7倍, $P<0.05$)。高脂饲养组1 min后血糖浓度下降缓慢,3、5、10 min血糖水平均高于正常饲养组($P<0.05$)。高脂饲养组胰岛 β 细胞凋亡率比正常饲养组增加40.0%($P<0.01$)。高脂饲养组胰岛细胞UCP-2基因mRNA表达与正常饲养组相比升高22.4%($P<0.01$)。**结论:**高脂喂养28周后SD大鼠胰岛 β 细胞凋亡率明显增加,血浆及胰岛细胞中MDA升高、GSH降低,而且胰岛细胞UCP-2基因mRNA表达升高,提示氧化应激可能参与了高脂引起的 β 细胞脂性凋亡。

[关键词] 胰岛/细胞学;胰岛/病理生理学;氧化应激; β 细胞;凋亡;解偶联蛋白-2

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)06-0620-06

Relationship between oxidative stress and β cell lipoapoptosis in rats

LOU Da-jun, LI Hong-liang, YANG Wen-ying, XIAO Jian-zhong, DU Rui-qin, WANG Bing, BAI Xiu-ping, PAN Lin (Department of Endocrinology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of β cell lipoapoptosis after long term high-fat feeding in rats, and to investigate the relationship between oxidative stress, gene expression and β cell lipoapoptosis. **Methods:** Forty-one SD male rats were randomly divided into 2 groups: high-fat diet group (HF group) and control group (NC group). At the end of 28 weeks, the levels of malondialdehyde (MDA) and glutamylcysteinylglycine (GSH) in plasma and pancreatic tissue, the early-phase insulin secretion in β cells, the β cell apoptosis (TUNEL technology) and the

收稿日期: 2008-09-02 修回日期: 2009-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30640081)。

作者简介: 楼大钧(1974-),男,内分泌学硕士,副主任医师,从事内分泌临床工作,目前在浙江省绍兴市人民医院内分泌科工作;E-mail: loudajun@sina.com.

通讯作者: 杨文英(1946-),女,教授,博士生导师,从事内分泌基础及临床研究;Email: wf1921@yahoo.com.cn.

uncoupling protein 2 (UCP2) gene expression in islets were measured. **Results:** The concentrations of MDA both in plasma and pancreatic tissue were higher in HF group than those in NC group. In contrast, The contents of GSH both in plasma and pancreatic tissue were lower in HF group. Insulin secretion response to glucose load was significantly decreased in HF group (3.0 fold *vs* 5.7 fold, $P < 0.01$). Blood glucose levels at 3 min, 5 min and 10 min during IVGTT were significantly higher in HF group than those in NC group ($P < 0.05$). The frequency of β cell apoptosis was increased by 40.0% in HF group ($P < 0.01$). The gene expression of UCP2 in islets was increased by 22.4% in HF group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The frequency of β cell apoptosis in high-fat feeding rats is affected by oxidative stress, which results in increasing UCP2 gene expression.

[**Key words**] Islets of langerhans/cytol; Islets of langerhans/physiopathol; Oxidative stress; β cell; Apoptosis; UCP2

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009,38(6):620-625.]

2型糖尿病(T2DM)常伴有脂质代谢紊乱,而脂质代谢异常可参与T2DM的发生和发展。有关脂毒性对胰岛 β 细胞分泌功能的影响的机制较为复杂,氧化应激在其中所起的作用日益引起人们的关注。本研究采用TUNEL法观察高脂饲养肥胖大鼠胰岛 β 细胞凋亡率的变化,并分别测定血浆及胰腺组织氧化及抗氧化应激指标的含,采用定量PCR检测胰岛细胞UCP2基因的表达,旨在探讨长期高脂饮食对大鼠胰岛 β 细胞凋亡影响以及氧化应激在其中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及饲料配方 8周龄雄性SD大鼠41只,体重250 g左右(SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),按随机数字表法分为2组:正常饲养组($n=20$),采用普通饲料喂养,脂肪占总热量的10%;高脂饲养组($n=21$),采用高脂饲料喂养,脂肪占总热量的66%。所有动物单笼饲养,大鼠自由进食进水。每周测量大鼠体重,饲养28周。动物饲料由中日友好医院动物中心配制。

1.2 方法

1.2.1 颈动、静脉插管术 每组各6只,空腹14 h后进行颈动、静脉插管术。按50 mg/kg体重剂量腹腔注射2.5%戊巴比妥钠。麻醉生效后将大鼠固定于自制木板上。从颈前正中剪开皮

肤,切口长约1.5~2.5 cm,钝性分离皮下组织。暴露和分离右颈总静脉,以丝线结扎远心端。以眼科剪在颈总静脉切一小口,插入 $\varnothing 0.03$ cm硅化胶管(插管中预先注入50 U/ml肝素生理盐水溶液,并紧紧封住管出口),插入长度约2.0~2.5 cm,穿线,固定导管。另在右侧(近中线)剪开,钝性分离气管肌肉,找出颈总动脉,分离开迷走神经,丝线结扎远心端,用动脉夹夹住近心端,在颈动脉剪一小口,往近心方向插入 $\varnothing 0.03$ cm硅化胶管(插管中预先注入50 U/ml肝素生理盐水溶液,并紧紧封住管出口),插入导管长度约2.0~2.5 cm,穿线,固定导管。打开动脉夹,适当将插管往近心方向推送,以保证插管不易脱出。在塑料管引导下将颈动、静脉导管经皮下通道由耳后引出并固定。

1.2.2 静脉葡萄糖耐量试验 从颈静脉导管注入葡萄糖0.5 g/kg(浓度50%),剂量为1 g/kg体重。由颈动脉导管采血测基础、1 min、3 min、5 min、10 min血糖和胰岛素水平。每次采血均用一次性无菌2 ml注射器,采血约1 ml,注入无菌1.5 ml EP管内,即刻用自动血糖分析仪Biosen 5030测定血糖(过氧化物酶法),余血标本迅速高速离心,取上清即刻冻于-20℃冰箱保存后统一测定胰岛素。试验过程中自静脉定时推入肝素钠(100 IU/ml)以抗凝。计算葡萄糖下降速率常数(K):1 min、10 min血糖对数值计算回归方程,K表示每分钟葡萄糖浓度

下降占1 min 血糖的百分比, $K = 69.3T_{1/2}$, $T_{1/2}$ 为从1 min 最高点血糖值下降到该高峰一半血糖值所用的时间。

1.2.3 生化及氧化应激指标测定 血胰岛素采用放射免疫分析方法测定, 试剂盒购自Linco公司。血游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)采用酶法测定, 试剂盒购自英国Rondox公司。血浆与胰腺组织丙二醛(malonaldehyde, MDA)以及还原性谷胱甘肽(glutamylcysteinylglycine, GSH)水平采用化学比色法测定, 试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。

1.2.4 β 细胞凋亡计数 应用TUNEL原位末端标记法检测凋亡细胞(罗氏诊断公司)。凋亡细胞核着染深棕色, 同时对照连续切片中胰岛素染色阳性的细胞定为凋亡的 β 细胞。每个胰岛的 β 细胞凋亡率= β 细胞凋亡数/ β 细胞总数 $\times 100\%$, 每张切片中至少计数3~5个胰岛, 每只大鼠至少取2张胰腺切片, 每组至少取5只大鼠的胰腺切片。

1.2.5 Real-time PCR检测 β 细胞UCP-2 mRNA的表达 胰岛细胞分离及总RNA提取: 胰腺组织在解剖显微镜下修剪脂肪, 而后剪碎加入V型胶原酶(浓度为1 mg/ml), 37℃水浴、振荡、消化20 min, 用D-HANKS液终止消化。未消化的大块组织再加V型胶原酶(浓度为0.5 mg/ml)继续消化至所有组织消化完全。手工检出折光性不同于外分泌腺大小均一的胰岛200~250个/只大鼠, 具体步骤参见文献^[1]。用Trizol试剂(美国Invitrogen公司)一步法提取胰岛细胞总RNA, 具体步骤按试剂盒说明书进行, RNA用紫外分光光度计进行定量; 计算吸光度A260和A280比值来检测纯度, 比值均大于1.8, 电泳判定RNA的质量。逆转录合成cDNA: 使用(日本TOYOBO公司ReverTra Ace- α -TM)试剂盒合成胰岛细胞cDNA。取5 $\times$ RT buffer 4 μ l, dNTPs(各10 mmol/L)2 μ l, 随机引物1 μ l, 反转录酶1 μ l, RN酶抑制剂1 μ l, RNA样本5 μ l, 加入7 ml 无RNA酶水平总体系20 ml。反应条件: 30℃ 10 min, 42℃ 20 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min。合成的cDNA于-80℃冻存, 具体步骤参见文献^[1]。Real-time PCR合成DNA: 采用美国ABI公司7300型荧光定量

PCR仪, PCR反应体系: SYBR@PCR混合物25 μ l, 蒸馏水18 μ l, 上游引物1 μ l, 下游引物1 μ l, cDNA 5 μ l。反应条件: 95℃ 60 s, 1个循环; 95℃ 15 s; 60℃ 15 s; 72℃ 45 s; 40个循环, 最后加做熔解曲线分析。内参照为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。引物由上海生工生物公司合成。UCP2, sense 5'-AAGACCATTGCACGAGAGGAA-3', antisense 5'-AGGTCACCAGCTCAGTACAGTTGA-3'; GAPDH, sense 5'-CATGCCAACGCCCTCTTCGA-3', anti-sense 5'-TGTCCCCGTTCTCATCCTGCAC-3'。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因表达情况。取PCR产物6 μ l于3%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学处理 用SPSS 10.0统计分析软件处理实验数据, 所得数据符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 偏态分布的变量数据(胰岛素、FFA)以中位数(范围)表示, 并经对数转换后使之正态化再进行统计分析。两组均数间比较采用 t 检验, 两组间差异比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为统计学有显著性意义。

2 结果

2.1 两组大鼠一般情况及生化指标比较 经过28周喂养高脂饲养组体重、内脏脂肪占体重百分比以及FFA、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)均高于正常饲养组, 经 t 检验两组差异有统计学意义($P < 0.01$); 空腹血糖水平两组差异也有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 血及组织氧化应激指标比较 与正常饲养组相比, 高脂饲养组血浆MDA明显增高($P < 0.05$), 血浆GSH明显降低($P < 0.01$); 检测胰腺组织匀浆中的MDA浓度发现高脂饲养组明显高于正常饲养组($P < 0.05$), 而胰腺组织匀浆中的GSH浓度高脂饲养组低于正常饲养组($P < 0.01$)。见表2。

2.3 静脉葡萄糖负荷试验结果(两组间差异比较采用方差分析)

2.3.1 血糖变化 糖负荷后高脂饲养组、正常饲养组血糖水平均在1 min达峰值[(19.0 $\pm$ 1.7) vs (18.8 $\pm$ 1.6) mmol/L, $P > 0.05$], 但高脂饲养组1 min后血糖浓度下降缓慢, 3、5、10 min血糖水平均高于正常饲养组, 分别为3 min:

表1 两组大鼠体重、内脏脂肪比及生化指标比较

Table 1 Comparison of body weight, visceral fat ratio and laboratory characteristic level in the two groups of rats

组别	鼠数	大鼠体重/g	(内脏脂肪/体重)/%	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mIU·L ⁻¹)	FFA/(μmol·L ⁻¹)
正常饲养组	15	630.3±35.2	2.9±0.6	4.9±0.6	11.7(3.5~19.6)	342.0(233.0~420.0)
高脂饲养组	16	876.4±104.0 [#]	8.5±2.2 [#]	5.8±0.7 [*]	24.0(13.9~32.5) [△]	537.0(386.0~613.0) [△]

与正常饲养组比较, ^{*}*P*<0.05, [#]*P*<0.01, [△]经对数转换后*t*检验*P*<0.01。

表2 两组大鼠氧化应激指标比较

Table 2 Comparison of oxidative stress indexes in plasma and pancreas in the two groups of rats

组别	鼠数	胰腺组织		血浆	
		MDA/(nmol·mg ⁻¹ ·prot)	GSH/(mg·g ⁻¹ ·prot)	MDA/(nmol·ml ⁻¹)	GSH/(mg·ml ⁻¹)
正常饲养组	15	1.01±0.23	28.94±3.21	16.86±4.52	124.10±4.74
高脂饲养组	16	1.45±0.21 [*]	19.85±2.45 [#]	26.63±5.04 [*]	84.78±3.02 [#]

与正常饲养组比较, ^{*}*P*<0.05, [#]*P*<0.01。

(16.1±1.9) vs (14.7±0.6)mmol/L;5 min:
(14.6±2.2) vs (12.7±0.9)mmol/L;10 min:
(12.4±1.7) vs (10.5±1.0)mmol/L (*P*均<0.05),见图1。高脂饲养组葡萄糖下降速率常数*K*值明显低于正常饲养组(8.9±1.3 vs 13.3±1.4, *P*<0.01)。

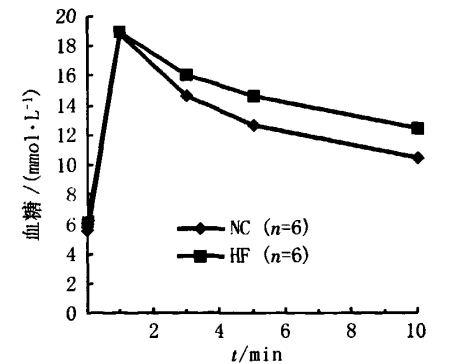


图1 静脉葡萄糖耐量试验血糖动态变化
Fig.1 Changes of glucose levels during intravenous glucose intravenous tolerance test

2.3.2 早相胰岛素反应 高脂饲养组0~10 min 胰岛素曲线下面积也高于正常饲养组 [(417.7±89.2) vs (296.4±78.4)mIU/L, *P*<0.01],见图2。糖负荷后1 min 高脂饲养组胰岛素高峰水平与正常饲养组无明显差异。但与基础值比较,高脂饲养组胰岛素增高的幅度却低于正常饲养组(3.0倍 vs 5.7倍, *P*<0.05)。

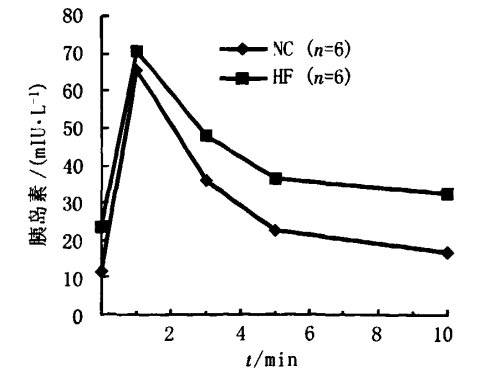


图2 静脉葡萄糖耐量试验胰岛素动态变化
Fig.2 Changes of insulin levels during glucose intravenous glucose tolerance test

2.4 胰岛β细胞凋亡率比较 高脂肥胖大鼠胰岛β细胞内可见较多的凋亡细胞,细胞核染色质浓缩,核呈棕黄色;而正常对照组胰岛β细胞内凋亡细胞较少,细胞核染色质形态正常,核呈蓝色。高脂组凋亡率显著高于正常饲养组 $[(21\pm 8)\% \text{ vs } (15\pm 5)\%, P<0.01]$,高脂组凋亡率比正常组增加40.0%。见图3。

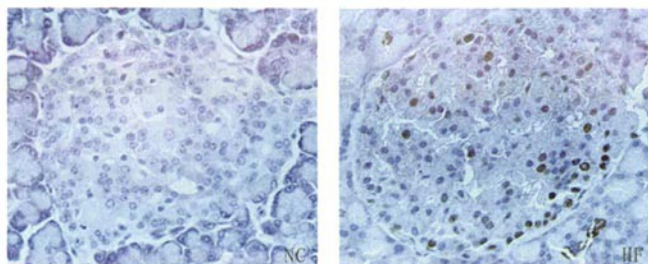


图3 高脂肥胖大鼠胰岛β细胞内可见较多的凋亡细胞,细胞核染色质浓缩,核呈棕黄色;而正常对照组胰岛β细胞内凋亡细胞较少,细胞核染色质形态正常,核呈蓝色。(×400倍)

Fig.3 The β cell apoptosis in NC group and HF group, based on TUNEL technology

2.5 Real-time PCR 检测UCP-2 mRNA 表达结果 与正常饲养组相比,高脂饲养组胰岛细胞UCP-2 基因mRNA 表达升高22.4%,差别有统计学意义($P<0.01$),见图4。为验证扩增基因为目标基因,将荧光PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示GAPDH、UCP-2 基因扩增产物条带分子量与理论值接近,且并无杂带,证明

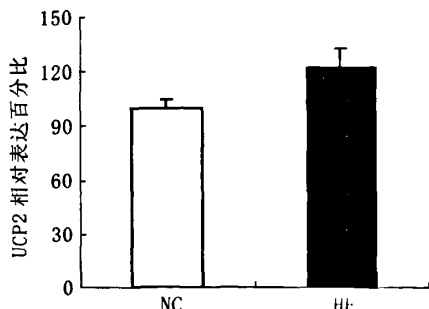


图4 UCP2 实时定量PCR 检测基因表达
Fig.4 Changes of UCP2 gene expression

该PCR 产物就是我们所要目标基因,见图5。

3 讨论

近年来研究发现,FFA 对胰岛β细胞脂毒性在T2DM 发生中起到重要作用,FFA 的长期升高可使胰岛β细胞数目减少,诱导细胞凋亡,称为脂性凋亡(lipoapoptosis)。目前研究显示这种脂性凋亡的发生和发展可能与氧化应激增加密切相关,但具体机制仍不十分清楚。

已有研究表明,长期高脂饮食喂养可导致胰岛β细胞分泌功能受损,凋亡增加^[2-3]。本研究同样发现高脂饮食喂养后大鼠糖负荷后第1min 血葡萄糖高峰与正常组无明显差异,而糖负荷后3min、5min、10min 血糖水平高于正常大鼠,血糖下降速率缓慢,同时发现肥胖大鼠糖刺激后第1min 胰岛素峰值较基础值升高仅3.0倍,升高倍率明显低于正常组5.7倍,并且0~10min 胰岛素曲线下面积高于正常组,肥胖大鼠尽管

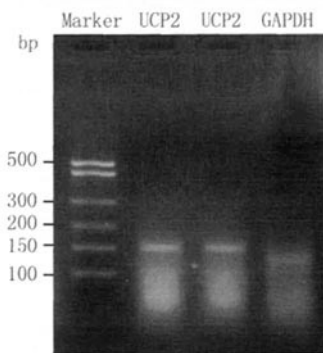


图5 PCR 产物电泳图
Fig.5 Electropherogram of PCR production

存在代偿性的血胰岛素水平绝对值升高,却不足以把糖负荷后血糖降至正常水平,这提示已出现β细胞早相胰岛素分泌功能相对不足。另外,我们还应用TUNEL 原位末端标记法检测β细胞凋亡率,发现肥胖大鼠β细胞凋亡较正

常组明显增加,肥胖大鼠胰岛 β 细胞内可见较多的凋亡细胞,细胞核染色质浓缩,呈棕黄色。这提示长期高脂喂养除了使胰岛 β 细胞早相分泌功能受损外,还导致了其脂性凋亡增加。

胰岛细胞因缺乏抗氧化酶类,易受氧化应激损伤^[4-5]。体外培养研究表明把胰腺 β 细胞株放入氧化剂 H_2O_2 中培养后,胰腺 β 细胞凋亡数量明显增加,而且其凋亡数量随 H_2O_2 浓度升高而增加^[6]。本研究发现肥胖大鼠血中MDA水平升高,而GSH低于正常,我们进一步检测胰腺组织的氧化应激指标发现肥胖大鼠胰腺组织中的MDA也明显升高,而GSH下降,说明脂毒性导致大鼠线粒体氧化应激增加,这就提示长期高脂喂养也可导致胰岛细胞氧化/抗氧化功能失衡,氧化应激增加,同时我们还发现肥胖大鼠同时存在胰岛 β 细胞凋亡增加,推测长期高脂喂养导致肥胖大鼠 β 细胞凋亡增加,可能与胰岛细胞自身的氧化/抗氧化失衡功能有关。

线粒体氧化应激的机制十分复杂,UCP2在线粒体内膜上广泛存在,最近已成为氧化应激中备受关注的研究热点^[7]。Li等发现氧化应激可使胰岛 β 细胞UCP2表达增加,可增强 β 细胞对的氧化应激抵抗力,使细胞线粒体的氧化磷酸化过程解偶联,降低ATP产生,从而导致 β 细胞胰岛素分泌功能受损^[8]。Zhang^[9-10]等发现UCP-2基因敲除小鼠与野生型小鼠相比,可以改善高脂喂养导致的 β 细胞功能紊乱,UCP-2抑制剂药物抑制Genipin可逆转肥胖和高血糖引起的 β 细胞功能紊乱。本研究也发现高脂喂养能导致 β 细胞氧化应激水平升高,同时UCP2表达比对照组增加22.4%。所以我们推测,高脂状态下 β 细胞胰岛细胞自身的氧化/抗氧化失衡功能与UCP2基因表达选择性地地上调存在一定的内在联系,胰岛细胞UCP2的表达增加可能是机体在高脂状态下氧化应激的一种调节机制,选择性地下调 β 细胞中的UCP2基因表达,可能是改善 β 细胞分泌功能、对抗氧化应激增加的一种手段,这有可能成为DM治疗的一个新方向。

References:

- [1] WANG Bing, LI Hong-liang, YANG Wen-ying, et al (王冰, 李宏亮, 杨文英, 等). Effect of lipid

infusion on the function of islet B cells and gene expression of insulin signal transduction system [J]. *Journal of Peking University: Health Sciences* (北京大学学报:医学版), 2007, 39(5): 462-466. (in Chinese)

- [2] BU Shi, YANG Wen-ying, WANG Xi, et al (卜石, 杨文英, 王昕, 等). Increased β cell apoptosis after 28 weeks of high fat feeding in male Sprague-Dawley rat [J]. *Chinese Journal of Diabetes* (中华糖尿病杂志), 2004, 6(12): 433-436. (in Chinese)
- [3] WINZELL M S, AHREN B. Durable islet effects on insulin secretion and protein kinase A expression following exendin-4 treatment of high-fat diet-fed mice [J]. *J Mol Endocrinol*, 2008, 40(2): 93-100.
- [4] MAIESE K, MORHAN S D, CHONG Z Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2007, 4(1): 63-71.
- [5] MIYAZAKI Y, KAWANO H, YOSHIDA T, et al. Pancreatic B-cell function is altered by oxidative stress induced by acute hyperglycaemia [J]. *Diabet Med*, 2007, 24(2): 154-160.
- [6] RAO P, MAEDA H, YUTONG X, et al. Protective effect of a radical scavenger, MCI-186 on islet cell damages induced by oxidative stress [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(8): 3457-3458.
- [7] LI Y, MAEDLER K, SHU L, et al. UCP-2 and UCP-3 proteins are differentially regulated in pancreatic beta-cells [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(1): e1397.
- [8] LI L X, SKORPEN F, EGEBERG K, et al. Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 273-277.
- [9] ZHANG C Y, PARTON L E, YE C P, et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(6): 417-427.
- [10] ANETOR J I, ASIRIBO O A, ADEDAO K S, et al. Increased plasma manganese, partially reduced ascorbate, and absence of mitochondrial oxidative stress in type 2 diabetes mellitus; implications for the superoxide uncoupling protein 2 (UCP-2) pathway [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2007, 120(1-3): 19-27.