2型糖尿病发病过程中胰岛炎症的动力学机理

雷蕾^{1*}, 林智立², 王琳琳^{1,3}, 赵德², 王友¹, 李方廷^{2*}

1. 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 中国科学院科教融合生物大分子卓越创新中心, 北京 100101;

2. 北京大学物理学院定量生物学中心, 北京 100871;

3. 中国科学院大学生命科学院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: dlei228@imm.ac.cn; lft@pku.edu.cn

2020-06-11 收稿, 2020-07-25 修回, 2020-07-27 接受, 2020-07-28 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2015CB910300)资助

摘要 2型糖尿病是一种以慢性高血糖为主要特征的代谢性疾病, 其发病机制复杂. 近年来的研究发现, 糖脂代谢紊乱造成的慢性炎症可引起机体胰岛损伤, 与2型糖尿病发生发展密切相关. 但是, 由代谢紊乱诱发的胰岛炎症如何发展并最终导致胰岛功能不可逆性损伤的机制尚未完全阐明. 本研究, 首先选取自发性2型糖尿病GK大鼠和转基因动物IDOL小鼠, 建立了胰岛炎症实验模型并对相关炎症因子变化进行检测, 结果显示巨噬细胞与胰岛炎症进程相关. 随后建立相应的定量数学模型描述胰岛 β 细胞和巨噬细胞相互作用, 理论模型的结果表明, 胰岛 β 细胞和巨噬细胞之间的正反馈回路可能导致IL-1 β 的激活过程存在不可逆双稳态和磁滞回线效应, 并导致胰岛炎症的不可逆性发展. 本研究提出了胰岛炎症过程中动力学机理, 希望能够为2型糖尿病发病机制的深入研究和治疗药物的研发提供新的思路和有益的帮助.

关键词 2型糖尿病, 胰岛炎症, 糖毒性, 脂毒性, 巨噬细胞浸润

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)是一种由于胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足, 导致代谢紊乱、血糖持续升高的慢性疾病. 长期的高血糖会引起机体大血管、微血管和神经的损伤, 导致一系列并发症, 如视网膜损伤、晶状体病变、心脑血管疾病、糖尿病肾病, 甚至糖尿病足导致的截肢等. 据国际糖尿病协会(International Diabetes Federation, IDF)估计, 2015年全球20~79岁成年人中有1/11(4.15亿)患有糖尿病, 治疗费用高达6730亿美元(占全球卫生支出的12%), 糖尿病及其并发症引起的死亡人数高达500万. 按当前情况发展, 2040年全球糖尿病患者人数将达到6.42亿^[1]. 因此, 研究糖尿病的发病机制, 寻找有效的治疗途径一直受到广大学者的高度关注.

目前研究认为, 糖毒性、脂毒性、氧化应激、内质网应激等因素会诱发胰岛的慢性炎症反应^[2]. 同时, 长期的炎症反应会加剧上述因素对胰岛 β 细胞的损伤^[3], 在T2D的发生发展过程中起重要作用. 糖尿病患者胰岛中出现的炎症征象表现为巨噬细胞等炎症细胞浸润, 炎症因子如白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等和趋化因子如CCL2、CCL3等表达水平增加. IL-1 β 是细胞因子白介素1(IL-1)家族的一员, 在T2D患者胰岛中, IL-1 β 主要由单核细胞、巨噬细胞、NK等炎症细胞分泌, 是炎症反应的重要调控因子. 在胰岛 β 细胞中, 高浓度葡萄糖促进硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)与硫氧还蛋白解离, 解离后的TXNIP与NLRP3炎症小体结合活化caspase 1, 最终促进pro-IL-1 β 的生成

引用格式: 雷蕾, 林智立, 王琳琳, 等. 2型糖尿病发病过程中胰岛炎症的动力学机理. 科学通报, 2020, 65: 4139–4148

Lei L, Lin Z L, Wang L L, et al. The dynamics mechanism of islet inflammation during type 2 diabetes progress (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4139–4148, doi: 10.1360/TB-2020-0708

和成熟IL-1 β 的释放。IL-1 β 释放后与胰岛 β 细胞表面受体IL-1R1结合,激活下游NF- κ B信号通路并促进炎症因子的表达。而游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)则通过TLR通路激活NF- κ B。NF- κ B不仅促进pro-IL-1 β 和NLRP3的转录,还可促进大量趋化因子CCL2、CCL3和CXCL8等的转录,进而招募巨噬细胞^[4]。同时,巨噬细胞在高糖高脂的刺激下,亦通过类似的信号通路生成更多的IL-1 β ,形成正反馈调节。这种正反馈回路将引起更多巨噬细胞浸润^[5],导致胰岛素分泌功能受损甚至 β 细胞凋亡^[6],最终加速T2D的发展。

Goto-Kakizaki(GK)大鼠是一种自发性T2D模型动物,其发病过程与人类T2D非常类似。除了高血糖、糖耐量受损等症状外,成年GK大鼠胰岛 β 细胞数量明显减少且功能受损^[7]。Hou等人^[8]对GK大鼠发病过程中5个时间点(4、6、8、16和24周)的胰岛组织中的基因和蛋白质表达水平进行系统分析发现,在GK大鼠疾病早期(4~6周)胰岛中出现低水平的炎症反应,但此时胰岛素合成仍能维持代偿性增加;在疾病后期(8~24周)胰岛炎症反应的急剧增强,伴随胰岛功能性代偿机制的丧失。因此对于GK大鼠胰岛炎症的研究,将有助于提高对于糖尿病发病机制的认识。

IDOL小鼠是由Iwawaki等人^[9]研发的一种转基因动物,携带有同时受IL-1 β 启动子和炎症小体双调控的荧光素酶报告基因。当小鼠体内存在促进炎症反应的因素时,活化IL-1 β 的水平升高,荧光素酶的表达增多,化学发光信号明显增强。由于可实时监测组织内IL-1 β 的活化程度且信/噪比高,因此IDOL小鼠是研究体内炎症变化理想的动物模型。

本研究对GK大鼠和IDOL转基因小鼠的胰岛在炎症过程中的相关因子表达变化进行检测。基于相关实验数据,构建了T2D的胰岛炎症理论模型,研究糖毒性、脂毒性、巨噬细胞浸润与胰岛 β 细胞之间的关系,揭示了巨噬细胞在胰岛炎症发生发展中的重要作用。

1 胰岛炎症变化的实验检测

为了研究糖毒性、脂毒性在胰岛炎症中的作用,尤其是游离脂肪酸和葡萄糖诱发胰岛炎症的过程,需要建立一套稳定可靠的实验体系。通过研究不同周龄GK大鼠和Wistar大鼠胰腺的炎症免疫组化特点,与不同浓度葡萄糖和棕榈酸(游离脂肪酸家族的重要成员之一)对体外培养IDOL小鼠原代胰岛的炎症反应影响,从体内实验和离体实验两个角度分析T2D中胰岛炎症

发生发展过程。

1.1 自发性T2D GK大鼠胰岛炎症中巨噬细胞浸润的变化

首先,利用自发性T2D GK大鼠研究糖尿病进程中胰岛内巨噬细胞浸润的变化。分别摘取4、6、8、16和24周GK大鼠和正常对照Wistar大鼠的胰腺,用4%多聚甲醛固定,并用石蜡包埋,制成5 μ m厚度的组织切片,进行免疫组化分析。另外,分别提取相应周龄的GK大鼠和Wistar大鼠的胰岛进行RNA-seq分析。胰腺切片分别用DAPI(蓝色)标记细胞核,胰岛素(黄色)标记胰岛 β 细胞,CD68(红色)标记巨噬细胞。结果如图1(a)~(c)所示,随着大鼠周龄的增加,GK大鼠胰岛中CD68⁺细胞逐渐增多,但Wistar大鼠胰岛中未见CD68⁺细胞增加。分析发现,GK大鼠胰岛中CD68⁺细胞浸润的过程可分为两个阶段:4~8周内CD68⁺细胞数极少,而8周之后CD68⁺细胞数陡增。这与RNA-seq分析结果相一致,即在8周后GK大鼠胰岛中IL-1 β 的mRNA水平急剧增加,而Wistar大鼠胰岛中IL-1 β 的mRNA却一直处于很低的水平(图1(d))。

由此推断,IL-1 β 表达剧增和巨噬细胞的大量浸润同步进行。4~8周,Wistar大鼠和GK大鼠血糖浓度对胰岛的累积效应未达到诱发胰岛炎症的阈值,因此胰岛中巨噬细胞数目较少;8周以后,GK大鼠持续处于高血糖状态,对胰岛的累积效应超过阈值,导致大量巨噬细胞浸润。以上结果提示,巨噬细胞的大量浸润是胰岛炎症发展进程中的一个重要环节。

1.2 不同浓度葡萄糖和棕榈酸对IDOL小鼠胰岛趋化因子CCL2表达水平的影响

随后,我们利用体外实验进一步研究葡萄糖和棕榈酸对于巨噬细胞的浸润过程的影响。用胶原酶灌注技术分离IDOL小鼠的胰岛,适应性培养过夜后(50个胰岛/孔)分别用含有不同浓度葡萄糖(5、11和25 mmol/L)和/或不同浓度棕榈酸(0.125、0.25和0.5 mmol/L)的RPMI1640培养基(含10%胎牛血清)培养1、5、8和12 h,提取胰岛细胞RNA并反转录为cDNA,通过Q-PCR检测胰岛中趋化因子CCL2的表达水平。结果如图2(a)~(c)所示,当葡萄糖浓度分别为5、11和25 mmol/L时,随着棕榈酸浓度增加和培养时间延长,CCL2表达逐渐增多。由于CCL2表达与巨噬细胞活化浸润密切相关^[10]。由此推断,葡萄糖和棕榈酸是促进CCL2表达,诱导炎症细胞浸润的重要因素。将培养12 h后胰岛CCL2

图 1 自发性2型糖尿病GK大鼠胰岛的巨噬细胞标记物CD68表达量和炎症因子 $IL-1\beta$ 表达水平明显高于正常Wistar大鼠。(a), (b) 不同周龄(4、6、8、16和24周)的GK大鼠和Wistar大鼠胰腺的免疫组化结果。用DAPI标记细胞核(蓝色), 用胰岛素标记 β 细胞(黄色), 用CD68标记巨噬细胞(红色)。(c) GK大鼠和Wistar大鼠胰腺胰岛CD68表达量的时间曲线($\chi \pm S$, $n=3-4$)。 (d) GK大鼠和Wistar大鼠胰腺胰岛 $IL-1\beta$ 表达水平的时间曲线($\chi \pm S$, $n=3$)

Figure 1 The expression level of macrophage marker CD68 and the transcription level of $IL-1\beta$ increased in spontaneous T2D GK rats pancreas islets compared with normal Wistar rats. (a), (b) The immunohistochemistry of pancreas in GK rats and Wistar rats at 4, 6, 8, 16 and 24 weeks. Nucleus were labeled with DAPI (blue), β cells were labeled with insulin (yellow), macrophage was labeled with CD68 (red). (c) The time course of CD68 expression in pancreas islets of GK rats and Wistar rats ($\chi \pm S$, $n=3-4$). (d) The time course of $IL-1\beta$ expression in pancreas islets of GK rats and Wistar rats ($\chi \pm S$, $n=3$)

的表达看作最终的稳态表达, 展示在不同葡萄糖浓度下, CCL2稳态对棕榈酸的响应。如图2(d)所示, 当初始葡萄糖浓度分别为5、11、25 mmol/L时, CCL2稳态激活到高态需要的棕榈酸浓度为0.25~0.5 mmol/L。由此推断, 棕榈酸诱发胰岛炎症的效果强于葡萄糖。

1.3 不同浓度葡萄糖和棕榈酸对IDOL小鼠胰岛生成IL-1 β 的影响

最后, 我们进一步对棕榈酸和葡萄糖共同诱导IL-1 β 产生的影响进行研究。分离IDOL小鼠胰岛, 适应性

培养过夜后, 挑选形状大小类似的胰岛(20个胰岛/孔)分别用含有不同浓度葡萄糖(5和25 mmol/L)和/或不同浓度棕榈酸(0.125、0.25和0.5 mmol/L)的RPMI1640培养基(含10%胎牛血清)培养24 h, 用小动物活体成像仪(Caliper Corporation, #IVIS Spectrum, 美国)检测胰岛中产生的化学发光信号强弱。结果如图3所示, 随着葡萄糖浓度和棕榈酸浓度增加, 胰岛中IL-1 β 生成逐渐增多。相关实验再次证实, 葡萄糖和棕榈酸是引起胰岛炎症的重要因素。

结果分析发现, 相较于5 mmol/L葡萄糖, 25 mmol/L

图 2 (网络版彩色)IDOL小鼠胰岛趋化因子CCL2的表达水平。(a)~(c) IDOL小鼠胰岛CCL2表达水平的时间曲线。IDOL小鼠胰岛在含有5(a)、11(b)或25 mmol/L(c)葡萄糖(glc), 和/或0.125、0.25或0.5 mmol/L棕榈酸(PA)的培养基中分别培养1、5、8和12 h。(d) IDOL小鼠胰岛在含有5(a)、11(b)或25 mmol/L(c)葡萄糖(glc)的培养基中分别培养12 h, 棕榈酸(PA)和CCL2表达水平的剂量效应关系。数值表示为 $\chi \pm S$, $n=3$ 。
Figure 2 (Color online) The expression level of CCL2 in islets of IDOL mice. (a)~(c) The time course of CCL2 expression in islets of IDOL mice. The islets of IDOL mice were cultured in medium containing 5 (a), 11 (b) or 25 mmol/L (c) of glucose (glc), and/or 0.125, 0.25 or 0.5 mmol/L of palmitic acid (PA) for 1, 5, 8 and 12 h. (d) The relationship of PA and the CCL2 expression when islets were cultured in medium containing 5 (a), 11 (b) or 25 mmol/L (c) of glucose (glc) for 12 h. Data was shown as $\chi \pm S$, $n=3$

葡萄糖可单独激活胰岛炎症反应, 因此, 无棕榈酸参与时, 激活胰岛炎症的葡萄糖反应阈值在5~25 mmol/L之间; 又因为0.125 mmol/L棕榈酸加5 mmol/L葡萄糖即可激活胰岛炎症, 所以无葡萄糖参与时, 激活胰岛炎症的游离脂肪酸反应阈值在0.125 mmol/L附近。这些阈值将为后续理论模型的参数选取提供实验依据。

2 胰岛炎症理论模型的构建及分析

2.1 理论模型和参数

在林智立等人^[11]的理论模型基础上, 结合图3数据, 建立新的简化的胰岛炎症模型, 并选取与实验相符合的

参数。在本研究的模型中, 分别用参数[glucose]和[FFA]表示体系内葡萄糖和FFA的浓度。在胰岛 β 细胞和巨噬细胞中, 用[inf]表示其中炎症小体的浓度, [caspase1]表示caspase 1的浓度, [NF- κ B]表示转录因子NF- κ B活性, [pro-IL-1 β]表示IL-1 β 前体浓度, [NLRP3]表示NLRP3浓度。[IL-1 β -IL-1 β R]为细胞表面IL-1 β 与受体IL-1R1结合的复合物的浓度。在细胞间质中, IL-1 β 的浓度表示为[IL-1 β], 趋化因子的浓度表示为[CCL2]。考虑单个胰岛内(体积为 V)的炎症反应, 本研究模型假设这个胰岛中有 n_{β} 个 β 细胞(单个细胞体积为 v_{β})和 m 个巨噬细胞(单个细胞体积为 v_M), v_0 为胰岛 α 或 δ 细胞、PP细胞等细胞的体积, 则单个胰岛内细胞间质的体积为 $V - n_{\beta} \times v_{\beta} - v_M \times m - V_0$ 。

本研究模型忽略pro-caspase 1的浓度变化和IL-1RA的作用, 保留了以前模型中的有关IL-1 β 生成过程的方程, 即原模型的式(1)、(3~5)和(7~9):

$$\frac{d[inf]}{dt} = (k_{a1}^f[FFA] + k_{a1}^g[glucose])[NLRP3] \\ [pro-caspase1] - k_{d1}[inf] \frac{k_{a2}[inf]}{K_{M2} + [inf]}, \quad (1)$$

$$\frac{d[caspase1]}{dt} = \frac{k_{a2}[inf]}{K_{M2} + [inf]} - k_{d2}[caspase1], \quad (2)$$

$$\frac{d[IL-1\beta]}{dt} = \left(\frac{k_{a3}[pro-IL-1\beta][caspase1]}{K_{M3} + [pro-IL-1\beta]} \right. \\ \left. \times \frac{n_\beta \times v_\beta + m \times v_M}{V - n_\beta \times v_\beta - m \times v_M - V_0} \right) \\ - k_{a4}[IL-1R1][IL-1\beta] \\ + k_{b4}[IL-1\beta \cdot IL-1R1] - k_{d3}[IL-1\beta], \quad (3)$$

$$\frac{d[IL-1\beta \cdot IL-1R1]}{dt} = k_{a4}[IL-1R1][IL-1\beta] - k_{b4}[IL-1\beta \cdot IL-1R1], \quad (4)$$

$$\frac{d[NF-\kappa B]}{dt} = \frac{k_{a5}\{k_{00} + [IL-1\beta \cdot IL-1R1] + [FFA][TLR] / ([FFA] + K_{M0})\}(N - [NF-\kappa B])}{K_{M5} + (N - [NF-\kappa B])} - \frac{k_{b5}[NF-\kappa B]}{K_{M5} + [NF-\kappa B]}, \quad (5)$$

$$\frac{d[pro-IL-1\beta]}{dt} = k_{a6} \frac{[NF-\kappa B]^2}{K_{M6}^2 + [NF-\kappa B]^2} - k_{d6} - \frac{k_{a3}[pro-IL-1\beta][caspase1]}{K_{M3} + [pro-IL-1\beta]}, \quad (6)$$

$$\frac{d[NLRP3]}{dt} = k_{a7} \frac{[NF-\kappa B]^2}{K_{M7}^2 + [NF-\kappa B]^2} - k_{d7}[NLRP3] - (k_{a1}^f[FFA] + k_{a1}^g[glucose])[NLRP3][pro-caspase1]. \quad (7)$$

胰岛 β 细胞和巨噬细胞中NF- κ B诱导产生趋化因子, 分泌到细胞间质中. 变量[CCL2]和[m]分别表示趋化因子浓度和巨噬细胞数目. 描述趋化因子和巨噬细胞浓度随时间变化的方程如下. 其中, 用希尔函数来描述趋化因子招募巨噬细胞的速率.

$$\frac{d[CCL2]}{dt} = \frac{k_{a8}[NF-\kappa B]^2}{K_{M8}^2 + [NF-\kappa B]^2} \\ \times \frac{n_\beta \times v_\beta + v_M \times m}{V - n_\beta \times v_\beta - v_M \times m - V_0} - k_{d8}[CCL2], \quad (8)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{k_{a9}[CCL2]^2}{K_{M9}^2 + [CCL2]^2} - k_{d9} \times m. \quad (9)$$

图3 (网络版彩色)IDOL小鼠胰岛IL-1 β 的表达量. IDOL小鼠胰岛在含有5或25 mmol/L葡萄糖(glc), 和/或0.125、0.25或0.5 mmol/L棕榈酸(PA)的培养基中分别培养24 h. 数值表示为 $\bar{x} \pm S$, $n=3$

Figure 3 (Color online) The signal of IL-1 β in islets of IDOL mice. The islets of IDOL mice were cultured in medium containing 5 or 25 mmol/L of glucose (glc), and/or 0.125, 0.25 or 0.5 mmol/L of palmitic acid (PA) for 24 h. Data was shown as $\bar{x} \pm S$, $n=3$

图4展示并比较了模型的模拟结果(深色线, 纵坐标在左侧)与实验结果(浅色线, 纵坐标在右侧). 选取一组与实验事实相符的参数. 根据理论分析, FFA促进IL-1 β 激活过程存在鞍-结点分岔. 当葡萄糖浓度为5 mmol/L时, 体系对FFA的响应为不可逆双稳; 当葡萄糖浓度为25 mmol/L时, 系统在生理状态下仅有单稳态, 且随着体系中FFA增加, IL-1 β 表达水平升高, 胰岛始终处于炎症状态. 这表明葡萄糖和FFA不仅可激活IL-1 β , 也可影响IL-1 β 的稳定性.

我们模拟一个正常的胰岛在糖脂刺激下产生炎症的过程. 方程中NF- κ B的总量为 N ; 设单个胰岛半径为45 μ m, 其中包含6个胰岛 α 或 δ 细胞、PP细胞, 它们的

图4 小鼠胰岛分泌炎症因子IL-1 β 的实验数据(其中浅红色线是葡萄糖浓度为25 mmol/L时的实验结果, 浅黑色线是葡萄糖浓度为5 mmol/L时的实验结果), 以及相应的理论模型结果(红色和黑色线)
Figure 4 The simulation of IL-1 β in islets of mice. The light red line is the experimental result with 25 mmol/L of glucose (glc), the light black line is the experimental result with 5 mmol/L of glucose (glc)

半径均设为11 μm ; 包括20个胰岛 β 细胞, 每个细胞半径为10 μm ; 每个巨噬细胞半径为17 μm . 胰岛 β 细胞和巨噬细胞中, 变量的初值均设为低态. 反应速率参数如表1.

2.2 巨噬细胞浸润在胰岛炎症产生过程中的作用

高糖高脂的短期刺激促使 β 细胞增殖, 但长期刺激会导致炎症因子如IL-1 β 等的分泌、 β 细胞凋亡、巨噬细胞浸润等, 从而诱发胰岛的慢性炎症反应. 各种研究证明, 糖毒性、脂毒性和大量巨噬细胞浸润是导致胰岛慢性炎症反应和 β 细胞功能受损的主要原因^[12,13].

在胰岛炎症产生过程中, IL-1 β 浓度越高, 表示炎症反应程度越剧烈, β 细胞凋亡损伤也越严重. 因此, 数学模型主要考察IL-1 β 浓度变化. 根据之前的文献报道和我们的实验结果, 胰岛处于正常状态时, 胰岛中IL-1 β 活性很低, 胰岛中几乎没有巨噬细胞浸润; 胰岛处于炎症状态时, 胰岛中IL-1 β 活性较高, 且伴随大量巨噬细胞浸润. 在非糖尿病人群, 每个胰岛平均有 0.52 ± 0.08 个炎症巨噬细胞浸润, 胰岛处于正常状态; 在T2D患者, 每个胰岛平均有 1.34 ± 0.18 个炎症巨噬细胞浸润, 胰岛处于炎症状态^[14].

前期已通过实验发现巨噬细胞与胰岛炎症过程密

表1 模型中的动力学参数

Table 1 Selected simulation parameters

参数	含义	取值	单位
N	NF- κ B总量	16	nmol/L
T	Toll样受体总浓度	5	nmol/L
I	IL-1 β 受体总浓度	5	nmol/L
k_0	NF- κ B自激活速率	0.04	nmol/L
K	FFA与TLR2解离常数	30	mmol/L
k_{a1}^g	葡萄糖激活炎症小体速率	350	$\text{L}^2/(\text{mmol}^2 \text{s})$
k_{a1}^f	FFA激活炎症小体速率	14000	$\text{L}^2/(\text{mmol}^2 \text{s})$
k_{d1}	炎症小体降解速率	0.006	s^{-1}
k_{a2}	caspase1的生成速率	0.1	nmol/(L s)
K_{M2}	caspase1酶促反应米氏常数	5	nmol/L
k_{d2}	caspase1的降解速率	0.001	s^{-1}
k_{a3}	IL-1 β 生成速率	0.0011	s^{-1}
K_{M3}	IL-1 β 酶促反应米氏常数	4	nmol/L
k_{d3}	IL-1 β 降解速率	0.04	s^{-1}
k_{a4}	IL-1 β 与IL-1R1结合速率	0.03	$\text{L}/(\text{nmol s})$
k_{b4}	IL-1 β 与IL-1R1解离速率	0.004	s^{-1}
k_{a5}	NF- κ B激活速率	0.8	s^{-1}
K_{M5}	NF- κ B希尔函数的常数	10	nmol/L
k_{b5}	NF- κ B失活速率	0.21	nmol/(L s)
k_{a6}	Pro-IL-1 β 转录速率	1	nmol/(L s)
k_{M5}	Pro-IL-1 β 希尔函数常数	5	nmol/(L s)
k_{d6}	Pro-IL-1 β 降解速率	1	s^{-1}
k_{a7}	NLRP3转录速率	5	nmol/(L s)
K_{M7}	NLRP3希尔函数常数	5	nmol/L
k_{d7}	NLRP3降解速率	1.1	s^{-1}
k_{a8}	趋化因子CCL2转录速率	3	nmol/(L s)
K_{M8}	趋化因子CCL2希尔函数常数	3	nmol/L
k_{d8}	趋化因子CCL2降解速率	0.5	s^{-1}
k_{a8}	巨噬细胞浸润的速率	1.6	cell/s
K_{M9}	巨噬细胞浸润的希尔常数	5	nmol/L
k_{d9}	巨噬细胞的凋亡和扩散速率	0.16	s^{-1}
n_β	胰岛 β 细胞数目	20	cell
v_M	单个巨噬细胞体积	20000	μm^3
v_β	单个胰岛 β 细胞体积	4000	μm^3
V	单个胰岛体积	393000	μm^3
V_0	胰岛 α 和 δ 细胞总体积	33000	μm^3

切相关. 随后, 将从理论上研究巨噬细胞对胰岛炎症的影响.

首先, 本研究分析了葡萄糖诱导胰岛炎症过程中,

巨噬细胞浸润数量、趋化因子和IL-1 β 三者的关系。我们定义巨噬细胞体积比例为巨噬细胞总体积/(巨噬细胞总体积+细胞间质体积): $\frac{v_M \times m}{V - n_\beta \times v_\beta - V_0}$ 。随着体系内葡萄糖浓度增加, 巨噬细胞体积比例和趋化因子逐渐增加, 但达到某阈值后便不再增加。当巨噬细胞体积比例达到约12%且趋化因子浓度达到约2.6 nmol/L, IL-1 β

激活并稳定在某一高态。在葡萄糖诱导胰岛炎症过程中, 巨噬细胞体积比例与趋化因子几乎成正比。

其次, 研究正常生理浓度葡萄糖([glucose]=5 mmol/L)诱导下, IL-1 β 浓度随巨噬细胞体积比例的变化关系。此时, 巨噬细胞体积比例作为参数, 模型中取消CCL2对巨噬细胞招募过程。模拟发现, 随着巨噬细胞体积比例增加, IL-1 β 激活过程也存在不可逆双稳态

图 5 (网络版彩色)葡萄糖诱导胰岛炎症过程中, 胰岛中IL-1 β 水平与浸润巨噬细胞数目和趋化因子(CCL2)等因素的理论模型分析结果。(a) 巨噬细胞体积比影响IL-1 β 的稳态浓度。(b) IL-1 β 稳态浓度与CCL2浓度的相互关系。(c) 巨噬细胞体积比与CCL2浓度的相互关系。在低浓度葡萄糖状态下, IL-1 β 稳态浓度与巨噬细胞体积比的关系(d)、IL-1 β 稳态浓度与CCL2浓度的关系(e)、巨噬细胞体积比与CCL2浓度的关系(f)

Figure 5 (Color online) The dynamical analysis of IL-1 β , infiltrated macrophages in the islet during the glucose-induced islet inflammation. (a) The relationship between the steady concentration of IL-1 β and the volume proportion of macrophage. (b) The relationship between the steady concentration of IL-1 β and the concentration of CCL2. (c) The relationship between the volume proportion of macrophage and the concentration of CCL2. (d) The dose response of the steady concentration of IL-1 β to the volume proportion of macrophage in low-glucose condition. (e) The dose response of the steady concentration of IL-1 β to the concentration of CCL2 in low-glucose condition. (f) The dose response of the volume proportion of macrophage to the concentration of CCL2 in low-glucose condition

和磁滞回线效应. 当巨噬细胞体积比例为48%时, IL-1 β 被激活. 胰岛处于炎症状态时, 即使胰岛中浸润的巨噬细胞全部为零或者被清除, IL-1 β 仍然处于高态. 因此, 我们推断, 前期巨噬细胞的浸润是导致胰岛炎症、 β 细胞受损、T2D难以治愈的原因之一, 也是IL-1 β 激活过程存在不可逆双稳态和磁滞回线效应的原因之一. 另外, 还发现, IL-1 β 被激活后, 随着巨噬细胞体积比例增加, IL-1 β 活性继续增加; 当巨噬细胞体积比例接近100%时, IL-1 β 浓度陡增, 这是因为此时细胞间质体积接近零.

最后, 研究低浓度葡萄糖([glucose]=2.8 mmol/L)诱导下, IL-1 β 稳态浓度随CCL2的变化关系. 此时CCL2浓度作为参数, 因此模型中取消了CCL2的产生过程. 模拟发现, 随着CCL2增加, IL-1 β 激活过程存在可逆双稳态和磁滞回线效应. 当CCL2浓度为13.1 nmol/L时, IL-1 β 被激活, 随后稳定在高态. 胰岛处于炎症状态时, CCL2浓度降到2.2 nmol/L以下, IL-1 β 才被抑制. 我们还研究了CCL2与巨噬细胞体积比例之间的关系, 发现随着CCL2增加, 巨噬细胞体积比例迅速增加并稳定在高态(巨噬细胞体积比例为72%). 巨噬细胞体积比例和IL-1 β 达到稳定的条件大致相同, CCL2浓度约为15 nmol/L. 因此, 我们认为, CCL2通过招募巨噬细胞, 加剧胰岛炎症过程.

从图5(d)~(e), 我们推断, 即使不存在 β 细胞招募巨噬细胞和巨噬细胞自激活这两个正反馈通路, 巨噬细胞对胰岛炎症的发展过程仍有促进作用. 胰岛 β 细胞和巨噬细胞中分泌IL-1 β 存在着正反馈, 巨噬细胞的浸润导致IL-1 β 激活的鞍节点分岔的糖浓度阈值降低. 所以在低糖环境下, 巨噬细胞浸润可以引起胰岛炎症. 再对比图5(a), (b), 当体系中存在 β 细胞招募巨噬细胞和巨噬细胞自激活这两个通路时, IL-1 β 激活所需要巨噬细胞的数量(体积比例)更少, 因此更容易产生胰岛炎症. 巨噬细胞在胰岛炎症中具有双重作用: 巨噬细胞既参与

了IL-1 β 生成过程, 还通过正反馈回路加剧胰岛炎症. 目前的实验研究表明, 适当控制T2D患者体内炎症水平可一定程度减缓胰岛素抵抗, 促进胰岛素分泌^[15~17].

3 结论与讨论

由于2型糖尿病的发病机制复杂, 涉及不同的器官和细胞类型, 其间存在着复杂的相互作用关系. 已有的糖尿病数学模型研究分析了其中不同的细胞类型和相互作用, 提出了可能的动力学机理和发病机制^[18,19], 并基于动力学网络提出了早期预警方法^[20].

本研究通过对大鼠胰岛炎症的实验数据和理论模型结果的分析证实, 在T2D的发生和发展过程中, 巨噬细胞与胰岛细胞的相互作用对胰岛炎症有着重要的促进作用. 首先, 通过研究自发性T2D GK大鼠胰岛炎症的变化过程, 发现随着糖尿病进程, 胰岛中的巨噬细胞浸润增加同时伴随IL-1 β 表达急剧上升; 通过检测葡萄糖和棕榈酸诱导IDOL小鼠胰岛CCL2表达水平的差异, 发现随着葡萄糖和棕榈酸浓度升高, 以及作用时间延长, CCL2表达水平逐渐增多; 并证实了葡萄糖和棕榈酸(FFA家族中的重要成员之一)可诱导胰岛IL-1 β 表达, 且棕榈酸的作用更强. 其次, 本研究构建了描述巨噬细胞与胰岛细胞相互作用的理论模型. 理论模型分析表明, 巨噬细胞自激活和 β 细胞招募巨噬细胞的两个正反馈回路导致胰岛中极少的巨噬细胞便可激活IL-1 β . 同时, 发现巨噬细胞浸润导致IL-1 β 激活过程存在不可逆双稳和磁滞回线效应. 我们还分析了CCL2促进胰岛产生炎症过程, 其中CCL2通过招募巨噬细胞间接促进IL-1 β 活化, 以及巨噬细胞在胰岛发生炎症反应的重要作用.

总之, 本研究将生物学实验数据与数学理论模型相结合, 定量地阐述了糖脂浓度对招募巨噬细胞和胰岛炎症水平的调控作用, 揭示了巨噬细胞在T2D发展过程中对胰岛炎症的重要影响, 为有效控制胰岛炎症, 保护和改善胰岛 β 细胞功能提供了理论依据.

参考文献

- 1 Zheng Y, Ley S H, Hu F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 88–98
- 2 Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, 2010, 11: 136–140
- 3 Allagnat F, Christulia F, Ortis F, et al. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia*, 2010, 53: 1120–1130
- 4 Donath M Y, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, et al. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24: 325–331

- 5 Ehse J A, Meier D T, Wueest S, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia*, 2010, 53: 1795–1806
- 6 Meyerovich K, Ortis F, Cardozo A K. The non-canonical NF- κ B pathway and its contribution to β -cell failure in diabetes. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61: F1–F6
- 7 Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*, 2007, 125: 451–472
- 8 Hou J, Li Z, Zhong W, et al. Temporal transcriptomic and proteomic landscapes of deteriorating pancreatic islets in Type 2 diabetic rats. *Diabetes*, 2017, 66: 2188–2200
- 9 Iwawaki T, Akai R, Oikawa D, et al. Transgenic mouse model for imaging of interleukin-1 β -related inflammation *in vivo*. *Sci Rep*, 2015, 5: 17205
- 10 Burke S J, Collier J J. Transcriptional regulation of chemokine genes: A link to pancreatic islet inflammation? *Biomolecules*, 2015, 5: 1020–1034
- 11 Lin Z L, Lei L, Li C R, et al. Dynamics model of inflammation in islets with Type 2 diabetes and the treatment strategies (in Chinese). *Acta Sci Nat Univ Pekinensis*, 2020, doi: 10.13209/j.0479-8023.2020.038 [林智立, 雷蕾, 李长润, 等. 胰岛炎症导致的2型糖尿病发病过程的动力学模型. 北京大学学报(自然科学版), 2020, doi: 10.13209/j.0479-8023.2020.038]
- 12 Maedler K, Schulthess F T, Bielman C, et al. Glucose and leptin induce apoptosis in human β - cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-jun N-terminal kinases. *FASEB J*, 2008, 22: 1905–1913
- 13 Giroix M H, Irminger J C, Lacraz G, et al. Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia*, 2011, 54: 2451–2462
- 14 Richardson S J, Willcox A, Bone A J, et al. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2009, 52: 1686–1688
- 15 Fleischman A, Shoelson S E, Bernier R, et al. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care*, 2008, 31: 289–294
- 16 Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor- α blockade with etanercept in obese patients with Type 2 diabetes. *J Vasc Res*, 2005, 42: 517–525
- 17 Larsen C M, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1—Receptor antagonist in Type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1517–1526
- 18 Karin O, Swisa A, Glaser B, et al. Dynamical compensation in physiological circuits. *Mol Syst Biol*, 2016, 12: 886
- 19 Ha J, Satin L S, Sherman A S. A mathematical model of the pathogenesis, prevention, and reversal of Type 2 diabetes. *Endocrinology*, 2016, 157: 624–635
- 20 Li M, Zeng T, Liu R, et al. Detecting tissue-specific early warning signals for complex diseases based on dynamical network biomarkers: Study of type 2 diabetes by cross-tissue analysis. *Brief Bioinf*, 2014, 15: 229–243

Summary for “2型糖尿病发病过程中胰岛炎症的动力学机理”

The dynamics mechanism of islet inflammation during type 2 diabetes progress

Lei Lei^{1*}, Zhili Lin², Linlin Wang^{1,3}, De Zhao², You Wang¹ & Fangting Li^{2*}

¹ Center for Excellence in Biomacromolecules, National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² Center for Quantitative Biology, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China;

³ College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding authors, E-mail: dlei228@imm.ac.cn; lft@pku.edu.cn

Type 2 diabetes is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia, which is mainly caused by insulin resistance and islet β -cells dysfunction. The increasing prevalence of type 2 diabetes worldwide poses a significant threat to human health. Studies showed that chronic inflammation induced by glucotoxicity and lipotoxicity impairs pancreatic islets function, which is associated with the progression of type 2 diabetes. However, the dynamic mechanism underlying dysfunction of pancreatic islets caused by chronic inflammation is still not fully understood.

As the systems biology develops, its multidisciplinary, holistic, systematic research approach affect many aspects of disease. Due to the rapid development of systems biology in the research of complex diseases in the past decade, it is considered to be an effective strategy for the study of type 2 diabetes mechanisms. Recent years, the systems biology approach based on bifurcation theory and quantitatively analyzing of multi-level data brings new ideas to highlight the mechanism of type 2 diabetes. Bifurcation theory can be used to explain the state transitions and genetic switches of certain biological processes, such as DNA damage and cell apoptosis. It has been widely accepted that the strong nonlinearity generated by positive feedback results in the bistability of the system. The biochemical switch with bistability and hysteresis, which is mainly caused by saddle-node bifurcation, provides a stable transition, even an irreversible transitions in physiological process.

In this study, experimental model of islet inflammation was established using spontaneous type 2 diabetes Goto-Kakizaki (GK) rats and transgene IDOL mice to detect the changes of inflammatory factors. We found that both macrophage infiltration and IL-1 β expression accelerates in GK rat islets during the progression of diabetes, especially in mid- and late-stage (8–24 weeks). The expression level of CCL2 is upregulated following the increase of glucose and palmitic acid concentration and extension of treatment time. Besides, treatment of glucose and palmitic acid promotes IL-1 β expression and activation in islets *in vitro*.

A mathematical model depicting interaction between macrophage and islet β cells was built based on the above observation, where macrophage cells activate IL-1 β in islet β cells with positive feedback loop. Our results showed that macrophage could influence the progression of islet inflammation. The positive feedback between pancreatic β cells and macrophages leads to saddle node bifurcation in the system. The bistable and hysteresis effect during the IL-1 β activation progress causing by saddle node bifurcation has showed that IL-1 β activation may be irreversible bistable, which will result in the irreversible development of islet inflammation. We investigated the IL-1 β level with and without the macrophages during the glucose-induced islet inflammation process.

We integrated cellular experiment with mathematical model, and analyzed quantitatively the effect of glucose and free fatty acid concentration on macrophage recruitment and islet inflammation. This dynamics mechanism of islet inflammation development will provide new insight on type 2 diabetes pathogenesis and treatment.

type 2 diabetes, islet inflammation, glucotoxicity, lipotoxicity, macrophage infiltration

doi: [10.1360/TB-2020-0708](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0708)