文章编号:1000-5404(2006)08-0813-03

论著

牛磺酸抗细胞因子诱导的原代培养胰岛细胞凋亡与抗凋亡蛋白A20的变化

余华荣[1],周 琴[1],董毅龙[1],张 能[1],周岐新[2] (重庆医科大学基础医学院:[1]生理学教研室,[2]药理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF)和γ-干扰素(IFN-γ)引起的原代培养胰岛细胞凋亡与A20蛋白表达变化以及牛磺酸对其影响。**方法** 用体外单层培养的方法,培养Wistar大鼠胰岛细胞,采用流式细胞仪、DNA电泳、放射免疫法及其RT-PCR等分别观察IL-1β、TNF和IFN-γ对胰岛细胞凋亡细胞百分率、DNA片段、培养液中胰岛素分泌以及A20蛋白表达的影响,并进一步观察牛磺酸的作用。**结果** 流式细胞仪分析显示IL-1β、TNF和IFN-γ联合可诱导胰岛细胞凋亡率增加(从3.5%增加到30.2%),DNA明显片段化,同时胰岛素分泌明显降低($P<0.01$),而A20蛋白无表达;牛磺酸能阻断上述细胞因子的作用($P<0.01$)。**结论** 牛磺酸能够改善细胞因子诱导的原代培养胰岛细胞凋亡,其机制可能与促进A20蛋白表达有关。

关键词: 白细胞介素-1β;细胞凋亡;A20;牛磺酸;胰岛细胞
中图法分类号: R322.57;R329.28/;R977.4 **文献标识码:** A

Taurine protects cultured pancreatic islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the anti-apoptotic protein A20

YU Hua-rong[1], ZHOU Qin[1], DONG Yi-long[1], ZHANG Neng[1], ZHOU Qi-xin[2] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of taurine on the apoptosis of cultured pancreatic islet cells, the change of insulin secretion and A20 protein expression induced by the combination of IL-1β, TNF and IFN-γ. **Methods** After isolated, pancreatic islet cells from Wistar rat were incubated in monolayer *in vitro* and incubated with the combination of IL-1β, TNF and IFN-γ. Insulin secretion were detected, the protein expression of A20 was examined by RT-PCR, apoptosis was detected by flow cytometry and DNA electrophoresis, and the effects of taurine on the changes of them were further investigated. **Results** The combination of IL-1β, TNF and IFN-γ induced a significant decrease of insulin content, flow cytometry analysis showed that apoptotic percentage of pancreatic islet cells remarkably increased (from 3.5% to 30.2%) following the addition of cytokines, agarose electrophoresis revealed special DNA ladder, the expression of A20 was not be found by means of RT-PCR. These effects were blocked by addition of taurine and A20 expression was up-regulated. **Conclusion** Taurine can attenuate the cytokine-induced apoptosis of cultured β cells, the mechanism of which may be by promoting the expression of A20.

Key words: interleukin-1β; apoptosis; A20; taurine; islet cells

1型糖尿病是具有一定遗传基础、在多种环境因子触发下,由T淋巴细胞介导的自身免疫性疾病。细胞因子作为免疫反应的中介者和调节者,在1型糖尿病发病过程中起重要作用。有研究证实,作为免疫损伤的主要效应分子IL-1β,TNF和IFN-γ可诱导多种属来源的β细胞株凋亡明显增加[1]。但对于原代培养的胰岛细胞,上述细胞因子是否亦引起凋亡?目前有关报道还不多见。牛磺酸(taurine)是体内含量丰富的含磺酸基β氨基酸,作为内源性抗氧化剂在机体组织细胞的自稳态调节中起重要作用,而且具有对抗多种细胞损伤的细胞保护功能。有研究表明,牛磺酸具有胰岛素样生物效应[2]。此前,我们的工作亦证明,牛磺酸能对抗白细胞介素-1β引起的胰岛素分泌抑制[3]。本实验采用离体培养的新生大鼠胰岛细胞,进一步研究细胞因子诱导大鼠胰岛细胞凋亡与抗凋亡基因A20表达的变化,并探讨牛磺酸对胰岛细胞凋亡的保护及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

白细胞介素-1(IL-1β),肿瘤坏死因子(TNF)和γ-干扰素

作者简介:余华荣(1970-),男,重庆市丰都县人,硕士,讲师,主要从事内分泌病理生理方面的研究。电话:(023)68485069,E-mail:huarongyu2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-09-15;修回日期:2005-11-18

(IFN-γ)均购于军事医学科学院基础医学研究所;Hank 液,RPMI1640 培养液购于 GIBCO 公司;胶原酶Ⅴ型购于 Sigma 公司;pBR322DNA/BstNI Markers 购自北方同正公司;胰岛素放射免疫检测试剂盒为中国原子能同位素研究所产品;RNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物公司;PCR 试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司;牛磺酸为南京制药厂产品。Wistar 大鼠由本校实验动物中心供给。

1.2 大鼠胰岛细胞分离与培养

按张能等[3]的方法略加改良。出生 3 ~ 5 d 的 Wistar 乳鼠,无菌取出胰腺,Hank 液清洗后剪成 0.5 ~ 1 mm^3 大小,转入盛有胶原酶(2.0 g/L)的锥形瓶中,37 ℃恒温水浴振荡消化 30 min,150 目筛网过筛,离心(1 000 r/min)。加入含 10% 胎牛血清 1640 培养液,置含 5 % CO_2 培养箱内培养。24 h 后换液,去除贴壁的成纤维细胞。再用 RPMI1640 培养液调节细胞至适宜浓度,接种于培养板,分组进行实验。

1.3 实验分组

分离、培养的胰岛细胞分为 4 组:① 正常对照组:胰岛细胞不作任何处理;② 损伤组:培养液中加入 IL-1β 75 U/ml + TNF 250 U/ml + IFN-γ 250 U/ml;③ 牛磺酸保护Ⅰ组:培养液中加入 5 mmol/L 的牛磺酸后,再加入细胞因子(IL-1β 75 U/ml + TNF 250 U/ml + IFN-γ 250 U/ml);④ 牛磺酸保护Ⅱ组:培养液中加入 20 mmol/L 的牛磺酸后,再加入细胞因子(IL-1β 75 U/ml + TNF 250 U/ml + IFN-γ 250 U/ml)。各组均培养 24 h 后作检测。

1.4 流式细胞仪凋亡定量分析

收集各种不同条件培养后的细胞,PBS 洗涤后加碘化丙啶(PI)染液 4 ℃避光 30 min,流式细胞仪检测。数据用 Mod Fit LT 2.0 版应用软件分析。结果判断:分析 PI 荧光得直方图时,先用门技术排除聚集的细胞及发微弱荧光的细胞碎片,在 PI 荧光的直方图上,凋亡细胞在 G_1/G_0 期前出现一亚二倍体峰。

1.5 DNA 片段观察

收集不同培养条件的胰岛细胞,提取 DNA,1.5 % 琼脂糖凝胶电泳 2 h,电压 100 V,DNA 分子量标准用 pBR322DNA/BstNI,电泳结束后在 1 μg/ml 溴化乙锭中染色 30 min,紫外透射分析仪下观察。

1.6 胰岛素分泌量的测定

取收集的细胞培养液,用放射免疫法定量检测胰岛素分泌量。

1.7 A20 mRNA 表达的检测

采用 RT-PCR 法。琼脂糖电泳观察 A20 的表达。β actin (205 bp):正义链 5′- CCTGACCGAGCGTGGCTACAGC -3′,反义链 5′- CAAGGCTACGGGGCTCCGA -3′;A20(479bp):正义链 5′- TTTGAGCAATATGCGGAAAGC-3′,反义链 5′- CCTTACTGCTTACCCTGTTGA -3′。

1.8 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件处理,采用方差分析,组与组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 流式细胞仪测定结果

未加任何处理的正常对照组中,胰岛细胞的凋亡率处于较低水平,在加入细胞因子诱导的损伤组中细胞凋亡率明显增加($P<0.01$),在加入牛磺酸后细胞凋亡率较损伤组明显降低,经统计学分析差异显著($P<0.01$)(表 1)。

表 1 牛磺酸对细胞因子引起的胰岛细胞凋亡率及胰岛素水平变化的影响($n=3$)

组别	凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)	胰岛素水平 (μIU/ml)
正常对照组	4.0 ± 0.5	274 ± 18
损伤组	30.9 ± 6.3[a]	109 ± 11[a]
牛磺酸保护Ⅰ组	16.3 ± 4.2[ab]	178 ± 12[ab]
牛磺酸保护Ⅱ组	11.5 ± 3.7[ac]	225 ± 14[ac]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与损伤组比较;c:$P<0.01$,与牛磺酸保护Ⅰ组比较

2.2 不同培养条件下细胞培养液中胰岛素水平的变化

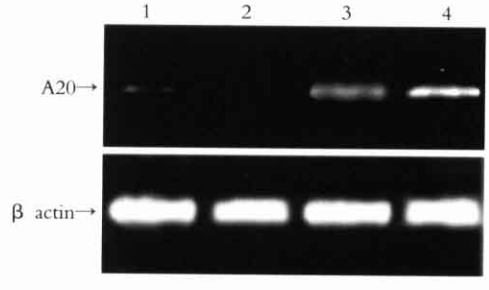
损伤组较正常对照组胰岛素含量显著降低;而牛磺酸保护组较损伤组胰岛素含量显著增高($P<0.01$)(表 1)。

2.3 不同培养条件下的胰岛细胞 DNA 电泳

在 DNA 电泳图中下观察到,正常对照组的胰岛细胞 DNA 电泳后为单一的大分子条带,而仅加入细胞因子的损伤组中可见 DNA 明显片段化。在加入了牛磺酸的保护组中,DNA 片段减少且变得模糊,并且牛磺酸保护Ⅱ组(牛磺酸为20 mmol/L)比牛磺酸保护Ⅰ组(牛磺酸为5 mmol/L)中的胰岛细胞 DNA 片段化倾向减少更甚。

2.4 胰岛细胞抗凋亡基因 A20 蛋白的表达

正常对照组 A20 表达很低,损伤组未见 A20 表达,预先采用牛磺酸处理的牛磺酸保护组检测到胰岛细胞 A20 的 mRNA 表达(图 1)。



1:正常对照组;2:损伤组;3:牛磺酸保护Ⅰ组;4:牛磺酸保护Ⅱ组

图 1 胰岛细胞 A20 表达的分析

3 讨论

1 型糖尿病以胰岛初始的炎症反应及其内或其周围细胞浸润为特征。炎症涉及的细胞成分包括 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞等。从浸润的淋巴细胞和巨噬细胞释放的细胞因子,主要是 IL-1β、TNF 和 IFN-γ 作为免疫效应分子,抑制胰岛素自胰岛 β 细胞分泌、诱发 β 细胞损伤、凋亡,并在多种属动物细胞株上进一步证明,其中 IL-1β 起着主要的直接作用[1,4]。本研究在大鼠离体培养的原代胰岛细胞上亦获得完全一致的结果,提示诱导 1 型糖尿病发生的

病理学机制，具有高度同源性，并未表现出种属差异。

在实验中我们观察了抗凋亡蛋白 A20 的表达。A20 是机体抗炎不可缺少的重要物质，具有抗凋亡和坏死作用。有资料表明，A20 对胰岛细胞有保护作用，用基因工程在胰岛内过表达 A20，可以使得 STZ 糖尿病大鼠发病率下降，并可以抑制细胞因子诱导的离体胰岛细胞的凋亡[5]。许多细胞在受外界损伤因子刺激时都有 A20 的表达，我们在本实验中，使用 IL-1β、TNF 和 IFN-γ 诱导 β 细胞凋亡时并未在胰岛细胞上检测到 A20 的表达，结合相关文献[6]，我们推测其原因可能是由于细胞因子引起 A20 表达出现和持续的时间与我们采样时间上的差异错落所致，这有待于后续实验验证。

牛磺酸即 2-氨基乙磺酸（$H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3H$），广泛分布在动物机体的组织细胞内，具有广泛的生物学效应。虽然，牛磺酸具有胰岛素样生物学效应已较早为人们所认识，但对胰岛 β 细胞的保护作用迄今报道并不多见，20 世纪 70 年代开始，国外有报道牛磺酸可保护胰岛 β 细胞的内分泌功能[7]。此前我们利用牛磺酸能明显反转 IL-1β 引起的胰岛细胞分泌抑制，并且具有明显的量效关系[3]。本研究运用直接诱导 1 型糖尿病的细胞因子作用于离体培养的 Wistar 大鼠胰岛细胞，证明上述细胞因子可诱导胰岛 β 细胞发生大量凋亡，而同时加入牛磺酸共同孵育后的 β 细胞凋亡率显著低于损伤组，胰岛素分泌量明显增加，细胞 DNA 电泳梯度现象减弱。再次证明牛磺酸对细胞因子引起的胰岛 β 细胞凋亡具有明显的保护作用。在加入牛磺酸的保护组中，检测到胰岛细胞 A20 的 mRNA 表达。因此，我们推测牛磺酸对抗细胞因子诱导胰岛 β 细胞凋亡，其机制可能是促进抗凋亡基因 A20 的表达而实现的。

参考文献：

[1] NERUP J, MANDRUP-POULSEN T, MOLVIG J, *et al*. Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes [J]. Diabetes Care, 1988, 11(Suppl 1): 16 - 23.

[2] 王丽娟，王　勇. 牛磺酸药理作用的研究进展[J]. 天津药学，2004，16(5)：46 - 48.

[3] 张　能，方海立，张　英，等. 牛磺酸对白细胞介素-1β 损伤的胰岛细胞分泌的影响[J]. 中国糖尿病杂志，1996，4(4)：225 - 227.

[4] BENDTZEN K. Immune hormones (cytokines); pathogenic role in autoimmune rheumatic and endocrine diseases[J]. Autoimmunity, 1989, 2(2): 177 - 189.

[5] GREY S T, LONGO C, SHUKRI T, *et al*. Genetic engineering of a suboptimal islet graft with A20 preserves beta cell mass and function [J]. J Immunol, 2003, 170(12): 6250 - 6256.

[6] RIACHY R, VANDEWALLE B, KERR-CONTE J, *et al*. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 protects RINm5F and human islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the antiapoptotic protein A20 [J]. Endocrinology, 2002, 143(12): 4809 - 4819.

[7] GOODMAN H O, SHIHABI Z K. Supplemental taurine in diabetic rats: effects on plasma glucose and triglycerides [J]. Biochem Med Metab Biol, 1990, 43(1): 1 - 9.

（编辑　陈聪连）

（上接 812 页）

SPO_2 变化组间无明显差异（$P>0.05$），所有患者均未观察到恶心、呕吐、瘙痒、呼吸抑制和术后尿潴留等副作用。硬膜外注入追加量 5 min 后，观察组的麻醉平面较对照组高 1～2 个节段最大阻滞起效时间观察组（9.5 ± 2.6）min 明显快于对照组（16.7 ± 4.7）min（$P<0.01$）。

3　讨论

局麻药和阿片类药在硬膜外通过不同途径作用于神经元，罗哌卡因是通过阻断钠离子的内流阻断神经冲动传导，低浓度下，罗哌卡因对 A_β 纤维传导的阻滞不如布比卡因，但对 A_δ 和 C 纤维的阻滞比布比卡因更为有效。这种低浓度罗哌卡因对感觉和运动神经的阻滞较大差异，为临床镇痛而较少影响运动神经提供了方便。乳腺癌根治术一般要求上界从 $C_{3,4}$ 下界至 $T_{7\sim8}$ 广平面阻滞，可导致部分脑肌和肋间肌麻痹，对呼吸功能影响较大。应用 0.375% 的罗哌卡因对运动神精阻滞较轻，即使高平面也不致严重影响呼吸功能[1]。芬太尼硬膜外给药后，不仅可通过静脉吸收入血，还可通过渗透进入脑脊液，作用于脊髓和神经根的阿片受体，通过脑脊液作用于中枢，从而起到镇静及镇痛的作用，且持续的时间长。加入小剂量局麻药可使硬膜外阿片受体激动剂作用更深强，镇痛持续时间延长，并可使阿片受体激动剂用量减少，不良反应减轻[2]。既往研究也显示芬太尼也可提高硬膜外布比卡因的镇痛平面[3]。这些研究表明小剂量阿片类药与局麻药联合应用可减少各自的用量，从而减少不良反应，尤其可为高危患者提供良好而安全的镇痛。根据这一特点本研究将 0.1 mg 芬太尼加到 0.375% 罗哌卡因溶液 10 ml 中用于硬膜外腔，能显著改善罗哌卡因硬膜外阻滞效果，缩短起效时间约 10 min，感觉阻滞水平增加 1～2 个节段，表明硬膜外用芬太尼与罗哌卡因具有协同作用。本研究中均未观察到如恶心、呕吐、瘙痒、呼吸抑制、尿潴留等副作用，也未见明显血流动力学波动，提示芬太尼复合罗哌卡因行 TEA 用于乳腺癌根治术具有镇痛完善、起效快、且无明显的副作用，是较为可取的一种麻醉方法。

关键词：硬膜外；芬太尼；罗哌卡因；乳腺癌
中图法分类号：R614　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈绍洋，熊利泽，王　强，等. 罗比卡因行胸段硬膜外阻滞对乳腺手术病人动脉血气的影响[J]. 临床麻醉学杂志，2002，18(12)：670 - 671.

[2] 杭燕南，王心良，蒋　豪，等. 当代麻醉学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2002：302.

[3] POLLEY L S, COLUMB M O, NAUGHTON N N, *et al*. Effect of intravenous versus epidural fentanyl on the minimum local analgesic concentration of epidural bupivacaine in labor[J]. Anesthesiology, 2000, 93(1): 122 - 128.

（编辑　栗　嘉）