文章编号:1000-5404(2011)11-1155-04

论著

二氮嗪干预氧化应激介导的INS-1细胞K_{ATP}通道作用机制的研究

朱 静,徐梓辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

【摘要】 **目的** 研究二氮嗪(diazoxide,DIZ)干预氧化应激对INS-1细胞ATP敏感性钾通道(Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels,K_{ATP} channels)SUR1亚基基因的表达影响。**方法** 将INS-1细胞株分为:①氧化应激组:将50、100、200、400 μmol/L H_2O_2分别加入各瓶细胞中培养3 h;②二氮嗪干预组:加入50 μmol/L二氮嗪培养INS-1细胞30 min后,加入400 μmol/L H_2O_2,继续培养3 h;③牛磺酸干预组:加入1 mmol/L牛磺酸培养INS-1细胞30 min后,加入400 μmol/L H_2O_2,继续培养3 h;④空白对照组:不加二氮嗪、牛磺酸及H_2O_2,其他培养条件相同。MTT检测氧化应激组细胞存活率、Elisa检测葡萄糖刺激的胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)、Western blot分别检测3组各SUR1亚基蛋白的表达。**结果** H_2O_2处理INS-1细胞3 h与对照组相比较后50 μmol/L组细胞存活率(105.27±3.83)%稍升高($P<0.05$),200 μmol/L组、400 μmol/L组细胞存活率分别为68.66%和51.67%均显著降低($P<0.05$、$P<0.01$);与对照组(112.87±9.28)mU/L相比较,50 μmol/L H_2O_2组GSIS量(118.47±10.15)mU/L升高($P<0.05$);200 μmol/L组(85.79±7.03)mU/L、400 μmol/L组(64.59±4.53)mU/L细胞均显著降低($P<0.05$,$P<0.01$);不同浓度H_2O_2培养INS-1细胞3 h后SUR1亚基蛋白的表达50 μmol/L组较正常组有升高($P<0.05$),100 μmol/L H_2O_2组较正常组无统计学差异,200、400 μmol/L组比对照组明显升高($P<0.05$);二氮嗪干预组SUR1亚基蛋白表达比对照组显著升高($P<0.01$),牛磺酸干预组与对照组比较无明显升高($P>0.05$)。**结论** 低浓度H_2O_2可以促进细胞增殖与胰岛素分泌,中、高浓度H_2O_2抑制细胞增殖与胰岛素分泌,二氮嗪抑制细胞K_{ATP}通道SUR1亚基的表达,可能是通过抑制线粒体呼吸链电子转运抑制ROS的释放,减轻细胞氧化应激的程度。

【关键词】 胰岛细胞;K_{ATP}通道;SUR1亚基;二氮嗪
【中图法分类号】 R322.57;R329.25;R977.9 【文献标志码】 A

Mechanism of adenosine triphophate sensitive potassium channel in INS-1 cells mediated by diazoxide-interfered oxidative stress

Zhu Jing, Xu Zihui (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of diazoxide (DIZ)-interfered oxidative stress on expression of SUR1 subunit gene in adenosine triphosphate sensitive potassium (KATP) channel of INS-I cells. **Methods** INS-1 cell strains were divided into oxidative stress group, DIZ interfere group, taurine interfere group, and control group. H_2O_2 was added into INS-1 cell strains of oxidative stress group at the concentration of 50 μmol/L, 100 μmol/L, 200 μmol/L, and 400 μmol/L respectively, and cultured for 3 h. DIZ was added into INS-1 cell strains of DIZ interfere group at the concentration of 50 μmol/L and incubated for 30 min, then DIZ was added at the concentration of 400 μmol/L and incubated for an additional 3 h. Taurine was added into INS-1 cell strains of taurine interfere group at the concentration of 1 μmol/L and incubated for 30 min, then H_2O_2 was added at the concentration of 400 μmol/L and cultured for an additional 3 h. No DIZ, taurine, and H_2O_2 were added into INS-1 cell strains of control group. Survival rate of INS-1 cell strains, glucose simulated insulin secretion (GSIS) level, and SUR1 subunit protein expression level were measured by MTT assay, ELISA, and Western blotting, respectively, in oxidative stress group, DIZ interfere group, and taurine interfere group. **Results** The survival rate of INS-1 cell strains [(105.27±3.83)%] was significantly higher in oxidative stress group than in control group after exposed to 50 μmol/L H_2O_2 ($P<0.05$) and gradually decreased with the increased concentration of H_2O_2. The survival rate of INS-1 cell strains was 68.66% and 51.67%, respectively, in oxidative stress group after exposed to 200 μmol/L and 400 μmol/L of H_2O_2, which was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). The GSIS level was higher in oxidative stress group than in control group after exposed to 50 μmol/L H_2O_2 (118.47±10.15 mU/L *vs* 112.87±9.28 mU/L,

【基金项目】 重庆市科委自然科学基金(2008C169)
【通信作者】 徐梓辉,E-mail:zihuixu@yahoo.com.cn

$P<0.05$) and gradually decreased with the increased concentration of H_2O_2. The GSIS level was significantly lower in oxidative stress group than in control group after exposed to 200 μmol/L and 400 μmol/L of H_2O_2 (64.59 ± 4.53 mU/L *vs* 85.79 ± 7.03 mU/L, $P<0.05$). The expression level of SUR1 subunit protein in INS-1 cells was higher in oxidative stress group than in control group after exposed to 50 μmol/L H_2O_2 for 3 h and significantly higher in DIZ group than in control group after exposed to 200 μmol/L and 400 μmol/L H_2O_2 for 3 h ($P<0.05$). However, no significant difference was observed between taurine interfere group and control group ($P>0.05$). **Conclusion** DIZ inhibits the expression of SUR1 subunit gene in K_{ATP} channel of INS-I cells by suppressing the release of ROS through inhibiting the electronic transport in respiration chain of mitochrondria, thus reducing the oxidative stress of INS-I cells.

[Key words] pancreatic beta-cells; adenosine triphosphate sensitive potassium channel; SUR1 subunit; diazoxide

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2008C169). Corresponding author: Xu Zihui, Tel: 86-23-68755709, E-mail: zihuixu@yahoo.com.cn

糖尿病是一种在世界范围内快速增长的疾病,根据2007－2008年新近流行病学调查结果显示,我国20岁以上年龄段糖尿病患病率为9.7%,我国目前成人糖尿病患病人数高达9240万[1]。其并发症对患者的生活质量和生命威胁极大,其死亡率已位居各种疾病的前列,给患者本人带来极大的痛苦,给社会、家庭带来沉重的经济负担。如糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病最严重的慢性并发症之一,也是导致终末期肾衰竭的主要原因。在美国DN是最常见导致终末期肾病的原因[2]。胰岛细胞功能障碍是2型糖尿病发生、发展的重要发病机制之一。许多研究表明,各种因素引起的显著和(或)持续的氧化应激是引起和(或)加重胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)和胰岛细胞功能衰竭的重要原因。因此,维持胰岛细胞正常的功能是预防和治疗糖尿病的有效途径之一。本研究旨在研究二氮嗪对氧化应激介导的INS-1细胞K_{ATP}通道亚基SUR1的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

SUR-1兔克隆抗体(H-80:SC-25683)购自美国Santa Cruz公司,RAPI细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(Prod# 31460)购自美国Pierce公司,RPMI1640培养基、胎牛血清、0.25%(含EDTA)胰蛋白酶溶液均购于美国HyClone公司,MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司,大鼠胰岛素试剂盒购自上海朗顿生物公司,30%过氧化氢溶液(Hydrogen perixode solution,H3410-1G-A)、二氮嗪(Diazoxide,DIZ)购自美国Sigma公司,牛磺酸(Taurine)购自北京中杉公司。

1.2 实验方法

1.2.1 INS-1细胞培养 INS-1大鼠胰腺癌细胞株(第三军医大学新桥医院内分泌科提供)置于含10%胎牛血清RPMI-1640培养基中,37 ℃饱和湿度为5% CO_2的培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 实验分组 将对数期的INS-1细胞进行分组:①氧化应激组:将50、100、200、400 μmol/L H_2O_2分别加入各瓶细胞中培养3 h;药物干预组:②二氮嗪干预组:加入50 μmol/L二氮嗪培养INS-1细胞30 min后,加入400 μmol/L H_2O_2,继续培养3 h;③牛磺酸干预组:加入1 mmol/L牛磺酸培养INS-1细胞30 min后,加入400 μmol/L H_2O_2,继续培养3 h;④空白对照组:不加二氮嗪、牛磺酸及H_2O_2,其他培养条件相同。

1.2.3 MTT检测氧化应激组细胞存活率 96孔培养板接种细胞5×10^4/孔,每个浓度设3个复孔,每孔加入5 mg/ml MTT溶液10 μl,37 ℃饱和湿度5% CO_2培养箱中孵育4 h后,吸出MTT溶液,加入Formazan溶解液100 μl继续于37 ℃,5% CO_2培养箱中培养4 h。倒置显微镜下观察细胞内有无结晶体,在570 nm波长下测定各孔D(570)值,计算细胞存活率。

1.2.4 GSIS检测 INS-1细胞分组培养3 h后,用16.7 mmol/L葡萄糖KRBH液刺激60min后取上清,采用ELISA方法检测胰岛素分泌。

1.2.5 Western blot检测SUR1亚基的蛋白表达 使用RAPI细胞裂解液处理各组INS-1细胞,提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。沸水中煮5 min变性后,检测SUR1蛋白采用8%分离胶SDS-PAGE进行电泳,300 mA 2.5 h电转PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h后,加入一抗(兔多克隆抗体,1∶200)溶液4℃过夜,用TBST清洗10 min×3次,洗膜后加入二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔,1∶1 000)封闭1 h,ECL显影。用内参GAPDH进行校正。

1.3 统计学处理

使用Image-Pro Plus 10.0对图像进行分析,使用SPSS 13.0 for windows对数据进行分析,各实验至少重复3次,两组均数间比较用配对t检验。

2 结果

2.1 不同浓度过氧化氢对INS-1细胞增殖的影响

H_2O_2处理INS细胞3 h后,50 μmol/L组细胞存活率(105.27±3.83)%较正常组升高,有统计学意义($P<0.05$)。100、200、400 μmol/L组的细胞存活率分别为97.1%,68.66%和51.67%。随着浓度的增高,细胞存活为率逐渐下降,200 μmol/L组较正常组有明显下降($P<0.05$),400 μmol/L组

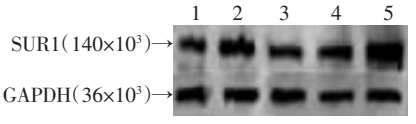
较正常组显著下降($P<0.01$)。

2.2 葡萄糖刺激胰岛素分泌量(glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)检测

随着 H_2O_2 浓度增加,I NS-1 细胞 GSIS 分泌逐渐减弱,其中 50 μmol/L 组(118.47 ± 10.15) mU/L 胰岛素分泌高于对照组(112.87 ± 9.28) mU/L($P<0.05$);100 μmol/L 组(107.11 ± 8.73) mU/L 较对照组无明显差异($P>0.05$);200 μmol/L 组(85.79 ± 7.03) mU/L 明显低于对照组($P<0.05$);400 μmol/L 组(64.59 ± 4.53) mU/L 明显低于对照组相($P<0.01$);从总体上看,GSIS 随着 H_2O_2 浓度增加呈递减趋势。

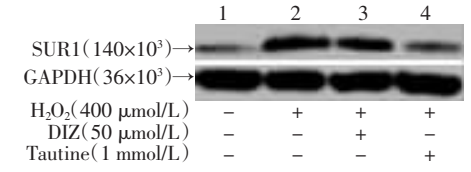
2.3 Western blot 检测 SUR1 亚基的表达

①氧化应激组 SUR1 亚基蛋白的表达:50 μmol/L H_2O_2 组较对照组有升高,有统计学意义($P<0.05$)。100 μmol/L H_2O_2 组较对照组无统计学差异,200 μmol/L H_2O_2 组、400 μmol/L H_2O_2 组比对照组明显升高($P<0.05$)。见图 1。②对照组、400 μmol/L H_2O_2 氧化应激组、药物干预组 INS-1 细胞 SUR1 亚基蛋白的表达:二氮嗪干预组 SUR1 亚基蛋白表达比正常组显著升高($P<0.01$),但低于 400 μmol/L H_2O_2 组。Taurine 干预组与正常比较,无明显升高($P>0.05$),见图 2。



1:对照组;2:50 μmol/L H_2O_2 组;3:100 μmol/L H_2O_2 组;4:200 μmol/L H_2O_2 组;5:400 μmol/L H_2O_2 组

图 1 氧化应激组 INS-1 细胞 SUR1 亚基蛋白的表达



1:对照组;2:400 μmol/L H_2O_2 组;3:50 μmol/L 二氮嗪干预组;4:1 mmol/L 牛磺酸干预组

图 2 对照组、氧化应激组、药物干预组 SUR1 亚基蛋白的表达

3 讨论

氧化应激是指各种原因引起的活性氧(reactive oxygen species, ROS)等高活性分子产生过多,超过机体自身的清除能力,造成氧化系统和抗氧化系统失衡,继而引起组织损伤[3-4]。近期的研究发现氧化应激可导致胰岛细胞发生胰岛素分泌抵抗(IR)[5]。IR 同时伴有高胰岛素血症,两者在糖尿病的发生、发展中起着极其重要的作用。H_2O_2 是一种代谢中间产物,同时也是一种 ROS。与高糖诱导的氧化应激相比较,H_2O_2 可轻易通过细胞膜,直接作用于线粒体,更快速地引起细胞氧化应激[6]。本实验选择 H_2O_2 作为建立氧化应激模型的诱导剂,不同剂量的 ROS 具有不同的生物学效应,低浓度 ROS 可作为第 2 信使调节细胞的生长与分化,而高水平 ROS 可引起许多生物大分子如蛋白质、脂类和核酸的氧化损伤,导致细胞衰老或凋亡[7]。以 H_2O_2 刺激 INS-1 细胞,在 50 μmol/L 时细胞出现增殖,胰岛素分泌量比对照组明显增高,提示 50 μmol/L 可促进细胞的生长、胰岛素的分泌,随着 H_2O_2 浓度的逐渐增加,细胞存活率及胰岛素分泌量逐渐下降,400 μmol/L 组已显著低于对照组。这与文献报道相一致。

ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive K^+ channels, K_{ATP} 通道)是由胞内 ATP/ADP 水平调控、非电压依赖性的、偶联细胞代谢和电活动的特殊钾离子通道。由 4 个内向整流钾通道(Kir6.1 或 Kir6.2)亚单位和 4 个调节性磺脲类受体(SUR1,SUR2A 或 SUR2B)组成的八聚体[8],在胰岛细胞中 K_{ATP} 通道以 SUR1/Kir6.2 的组合形式较多见[9]。SUR1 是磺脲类药物作用的主要靶点,调节 Kir6.2 对磺酰脲类药物和通道开放剂(KATP channel openers,KCOs)的敏感性,也增加 Kir6.2 对 ATP 的敏感性,并使 K_{ATP} 通道的功能得以完整表达[8]。SUR1 亚基可以保护胰岛细胞避免受到链脲佐菌素诱导氧化应激的损伤作用[10]。生理状态下,胰岛 β 细胞通过增加 K_{ATP} 通道数量维持血糖稳态[11],SUR1 亚基部分缺失可引起高胰岛素血症,SUR1 全部缺失则无胰岛素分泌[12]。本研究发现,随着 H_2O_2 浓度增加,SUR1 亚基的蛋白表达逐渐升高,可能因为剧烈而持续的氧化应激损害了线粒体,ATP/ADP 比值下降,Kir6.2 对 ATP 的敏感性降低,细胞为维持血糖稳定,需激活并上调 SUR1 亚基的表达来维持膜电位和电生理功能[13],这也可以解释糖尿病早期,胰岛 β 细胞受损但体内存在相对高胰岛素血症的原因。

二氮嗪是 K_{ATP} 通道开放剂。二氮嗪上调 SUR1 等 K_{ATP} 通道亚基保护胆碱能神经元免受氧化应激损害[13],还可以上调超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛表达减轻氧化应激,下调 CHOP 和 caspase-12 蛋白抑制细胞凋亡[14],同时通过激活线粒体 K_{ATP} 通道,使细胞膜极化而抑制 Ca^{2+} 内流,抑制胰岛素分泌同时可以下调凋亡基因的表达,抑制胰岛细胞细凋亡[15]。本研究发现二氮嗪上调 SUR1 基因,增加 SUR1 蛋白使 K_{ATP} 通道处于持续开放状态,抑制胰岛素分泌,使胰岛细胞进入静息状态。与传统的抗氧化药物牛磺酸相比较,虽然牛磺酸可抑制 K_{ATP} 通道 SUR1 亚基表达[16],但是我们在研究中未发现其影响胰岛细胞 K_{ATP} 通道 SUR1 亚基表达,不能抑制胰岛素分泌,不能使胰岛细胞进入静息状态,延长胰岛细胞凋亡周期。

本研究利用 H_2O_2 诱导氧化应激模型,证实氧化应激可上调 K_{ATP} 通道亚基 SUR1 的表达,并随着 H_2O_2 浓度的增加而表达增加,进一步引起胰岛素分泌紊乱。同时说明二氮嗪可能通过上调 SUR1 基因,增加 SUR1 蛋白使 K_{ATP} 通道处于持续开放状态,抑制胰岛细胞分泌胰岛素,使胰岛细胞进入静息状态,这也许能为改善 2 型糖尿病的胰岛细胞功能紊乱提供一个有效的治疗方法。

参考文献：

[1] Yang W, Lu J, Weng J, *et al*. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.

[2] Kiberd B. The chronic kidney disease epidemic: stepping back and looking forward [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2967-2973.

[3] Song F, Jia W, Yao Y, *et al*. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes [J]. Clin Sci (Lond), 2007, 112(12): 599-606.

[4] Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, *et al*. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(3): 355-366.

[5] Houstis N, Rosen E D, Lander E S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance [J]. Nature, 2006, 440(7086): 944-948.

[6] Koh G, Lee D H, Woo J T. 2-Deoxy-D-ribose induces cellular damage by increasing oxidative stress and protein glycation in a pancreatic beta-cell line [J]. Metabolism. 2010, 59(3): 325-332.

[7] Meigs J B, Larson M G, Fox C S, *et al*. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study [J]. Diabetes Care, 2007, 30(10): 2529-2535.

[8] Aittoniemi J, Fotinou C, Craig T J, *et al*. Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009, 364(1514): 257-267.

[9] Nichols C G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism [J]. Nature, 2006, 440(7086): 470 476.

[10] Gier B, Krippeit-Drews P, Sheiko T, *et al*. Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress [J]. J Clin Invest, 2009, 119(11): 3246 3256.

[11] Yang S N, Wenna N D, Yu J, *et al*. Glucose recruits K(ATP) channels via non-insulin-containing dense-core Granules [J]. Cell Metab, 2007, 6(3): 217-228.

[12] Yan F F, Casey J, Shyng S L. Sulfonylureas correct trafficking defects of disease-causing ATP-sensitive potassium channels by binding to the channel complex [J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33403 33413.

[13] Ma G, Gao J, Fu Q, *et al*. Diazoxide Reverses the Enhanced Expression of K(ATP) Subunits in Cholinergic Neurons Caused by Exposure to Abeta(1-42) [J]. Neurochem Res, 2009, 34(12): 2133-2140.

[14] Xu L, Han F, Mandal A, *et al*. Diazoxide attenuates hypothermic preservation-induced renal injury via down-regulation of CHOP and caspase-12 [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(12): 3859-3867.

[15] Huang Q, Bu S, Yu Y, Guo Z, *et al*. Diazoxide prevents diabetes through inhibiting pancreatic beta-cells from apoptosis via Bcl-2/Bax rate and p38-beta mitogen-activated protein kinase [J]. Endocrinology, 2007, 148(1): 81-91.

[16] Lim J G, Lee H Y, Yun J E, *et al*. Taurine block of cloned ATP-sensitive K + channels with different sulfonylurea receptor subunits expressed in Xenopus laevis oocytes [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(5): 901-910.

（收稿：2011-03-04 修回：2011-03-24）
（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2011)11-1158-01

高海拔地区中老年先天性心脏病临床诊断分析

周文蓉 （810000 西宁，青海红十字医院超声科）

【关键词】 高海拔地区；中老年；先天性心脏病
【中图法分类号】 R541.1 【文献标志码】 B

高海拔地区先天性心脏病青少年中患病率高达8.8%～13.7%[1]。高海拔地区成年人尤其是中老年先天性心脏病因长时间肺动脉高压，引起右心衰竭，肺部感染，易被诊断为慢性肺源性心脏病，常需予以鉴别诊断。本研究对我院内科2007年10月至2010年10月收治的18例先天性心脏病的中老年患者的临床特征、影像学检查，尤其是有确诊价值的超声心动图表现进行回顾分析，以期提高对该病诊断的认识。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选择2007年10月至2010年10月我院内科收治的以咳嗽、气喘、心悸及下肢浮肿为主诉入院；以肺动脉高压、右心衰竭为临床表现，最终确诊为先天性心脏病的中老年患者18例，其中男性6例，女性12例；年龄42～72岁（60岁以上者9例）；居住地区海拔2 260 m者8例，超过3 000 m者10例。

【通信作者】 周文蓉，E-mail：zwrhongshizi@163.com

1.2 诊断方法

常规胸部X线、心电图检查。所有病例均在右心功能不全缓解后行肺功能检测，使用美国产PROFILE肺功能测定仪测定用力肺活量（forced vital capacity，FVC）及1 s用力呼气容积（forced expiratory volume in one second，FEV1）。超声心动图检查，使用仪器为飞利浦IE33超声诊断仪，探头频率S1～5 MHz，由2名熟练的超声诊断医师操作，常规检查左室长轴、短轴，大动脉长轴、短轴，心尖四腔，剑下四腔，腔静脉长轴及胸骨上窝动脉导管等切面，并估测肺动脉压力。

2 结果

18例患者有8例心脏听诊未闻及杂音，10例可在胸骨左缘二尖瓣区、三尖瓣区听诊到病理性收缩期杂音，P2增强，双肺可闻及程度不同的干湿性啰音，多数病例有颈静脉充盈，下肢浮肿及肝淤血表现。胸部X线检查示：17例有肺动脉高压表现及肺纹理增粗，诊断为肺动脉高压，肺源性心脏病，仅1例提示诊断为先天性心脏病（室间隔缺损）。心电图检查：12例

（下转1164页）