基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.007

罗格列酮对实验性 1 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响

高会敏[1]，蒙碧辉[2]，韦静彬[3]，陈洪流[4]，林媛媛[5]

（1. 河南省周口市中心医院内分泌科，周口 466000；2. 广西医科大学第一附属医院内分泌科，南宁 530021；3. 广西柳州市人民医院传染科，柳州 545006；4. 广西医科大学第一附属医院急诊科，南宁 530021；5. 广西南宁市第一人民医院内分泌科，南宁 530021）

【摘 要】目的：观察罗格列酮（Rosiglitazone natrium，RSG）对实验性 1 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响。方法：6 周龄 SD 大鼠随机分成 3 组，正常对照（Control，Con）组 24 只，糖尿病（Diabetic mellitus，DM）组 24 只，罗格列酮干预（Rosiglitazone，RSG）组 24 只。以链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ）溶液单次腹腔注射，72 h 后测空腹血糖（Fasting blood glucose，FBG）≥16.7 mmol/L 为造模成功。应用罗格列酮后 5 个时间段（2、5、7、10、13 周），分别用 TUNEL（Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling）方法检测胰岛 β 细胞的凋亡，用免疫组化法检测胰岛中胰岛素（Insulin，Ins）及 Fasl 的表达。结果：与 DM 组相比，RSG 组胰岛表达胰岛素水平提高，β 细胞相对凋亡指数及 Fasl 表达水平均下降（P 均<0.05）。结论：罗格列酮能抑制或延缓 β 细胞凋亡，其机制可能与抑制 Fas/Fasl 细胞凋亡通路有关。

【关键词】罗格列酮；细胞凋亡；糖尿病；Fas/Fasl；胰岛 β 细胞

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-07-09

Effect of rosiglitazone on the apoptosis of beta cells in rats with experimental type 1 diabetic mellitus

GAO Hui-min[1], MENG Bi-hui[2], WEI Jing-bin[3], CHEN Hong-liu[4], LIN Yuan-yuan[5]

(1. Department of Endocrinology, Zhoukou Central Hospital; 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University; 3. Department of Infectious Disease, Liuzhou People's Hospital; 4. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University; 5. Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Nanning)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of rosiglitazone on the apoptosis of pancreatic beta cells in rats with experimental type 1 diabetic mellitus. *Methods*: Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group (Con, n=24) and diabetic control group (DM, n=24) and rosiglitazone group (RSG, n=24). Diabetic rats were induced by streptozotocin (STZ) injected intraperitoneally. Rats with fasting blood glucose (FBG) ≥16.7 mmol/L were served as diabetic model. Two-, five- seven-, ten-, and thirteen weeks after RSG treatment, the apoptosis of beta cell was eval-

作者介绍：高会敏（1980-），女，硕士，研究方向：内分泌及代谢性疾病。

通信作者：蒙碧辉，男，教授，Email: mengbh@163.com。

基金项目：广西科学基金资助项目（编号：桂科自 0640130）。

lial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement[J]. J Dent Res, 2003, 82(3): 177-182.

[9] Naik M U, Mousa S A, Parkos C A, et al. Signaling through JAM-1 and alphavbeta3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JMA-1 and alphavbeta3 complex[J]. Blood, 2003, 102(6): 2108-2114.

[10] Soldi R, Mitola S, Strasly M, et al. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2[J]. The EMBO J, 1999, 18(4): 882-892.

[11] Connolly J F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, 313(4): 8-18.

[12] Nisato R E, Tille J C, Jonczyk A, et al. Alpha v beta3 and alpha v beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro[J]. Angiogenesis, 2003, 6(2): 105-119.

[13] Robinson S D, Reynolds L E, Kostourou V, et al. Alphav beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(49): 33966-33981.

[14] 王晓滨，王 伟. 骨折修复中的血管新生[J]. 中国矫形外科杂志，2006，14(12)：939-940.

（责任编辑：关蕴良）

uated by Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and the levels of expression for insulin and Fasl were performed by immunohistochemistry. *Results*: Two weeks after RSG treatment, the levels of expression for insulin in the pancreas islet were higher ($P<0.05$) and the relative index of apoptosis of beta cells was lower ($P<0.05$) coupling a downgraded expression of Fasl ($P<0.05$) in RSG than that in DM. *Conclusion*: Rosiglitazone can inhibit or down regulating the apoptosis of beta cells to some extent in experimental type 1 diabetic rats, and one of the mechanisms was probably through inhibiting the apoptosis pathway of Fas/Fasl.

【Key words】rosiglitazone; apoptosis; diabetes mellitus; Fas/Fasl; pancreatic beta cell

1型糖尿病个体在其β细胞减少之前，其胰岛本身已经有炎症存在。大量炎症介质，包括T细胞，IL-1β，TNF-α，IFN-γ等，为细胞死亡通路Fas/Fasl的作用提供了有利的条件[1]。糖尿病患者的高血糖状态为Fas/Fasl凋亡途径的激活准备了条件。本研究用罗格列酮（Rosiglitazone，RSG）干预SD大鼠1型糖尿病模型，检测胰岛中Fasl的表达水平及胰岛β细胞的凋亡情况，探讨RSG保护β细胞是否与抑制细胞凋亡有关。

1 材料与方法

1.1 实验对象与建模

6周龄雄性清洁级SD大鼠72只，160~200 g（广西医科大学动物实验中心提供），自由进食、饮水。12 h明暗光线交替。室内温度20℃~25℃，湿度为60%~70%之间，保持通风换气。经适应性饲养1周后，全部大鼠空腹尾部静脉测血糖，眼内眦静脉采血测血清胰岛素作为基础值。随机分成3组，正常对照（Control，Con）组24只，糖尿病对照（Diabetic mellitus，DM）组24只和RSG干预组24只。后两组空腹经腹腔注射2%链脲佐菌素，Streptozotocin（65 mg/kg），建立1型糖尿病模型。Con组腹腔注射相应剂量的0.05 mol/L柠檬酸缓冲溶液。3 d后测空腹血糖（Fasting blood glucose，FBG），FBG≥16.7 mmol/L为造模成功。RSG成模当天开始给予RSG[7 mg/(kg·d)]灌胃，其他2组则给予相应剂量的溶剂生理盐水灌胃。此后定时于每天清晨（7 am~9 am）给药1次。观察13周。

1.2 标本收集

糖尿病成模当天及RSG干预后2、5、7、10、13周分别测定各组的体重、FBG并分别抽取动物4只，经10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后，剖腹取胰腺标本并置于4%多聚甲醛溶液中固定，待切片之用。

1.3 实验室检测

糖尿病成模时及RSG干预后的各时期分别检测各组动物FBG（罗氏血糖仪测定）。胰岛中胰岛素表达的检测用免疫组化SP法，试剂购自迈新生物工程公司。胰岛中Fasl的检测用免疫组化二步法，试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。胰岛中β细胞凋亡的检测采用TUNEL方法，试剂购自美国罗氏公司。

TUNEL方法检测细胞凋亡步骤：

4 μm病理切片→脱蜡→梯度酒精水化至水→蛋白酶K工作液（20 mg/L）37℃孵育→20%小牛血清+3%小牛血清白蛋白37℃孵育→50 μl Tunel反应液湿盒中避光37℃孵育0.3%甲醇溶液（1份3%H_2O_2+9份甲醇溶液）湿盒中室温孵育→20%羊血清+3%小牛血清白蛋白+1%封闭液湿盒中37℃孵育→PBS液按1:2稀释的converter-POD溶液湿盒中避光37℃孵育→DAB溶液显色→苏木素复染及中性树胶封片。

1.4 形态学观察

光镜（×40）下每份标本随机选取20个视野输入图像分析系统（德国DMR+Q550），计算胰岛内Fasl表达的相对灰度，并评估β细胞相对凋亡指数。

相对灰度值：对每个胰岛阳性部位和阴性部位进行灰度水平分析得灰度值（本病理图像分析仪设置0为白，255为黑），计算灰度值差[2]，取其平均值作为该样本的相对灰度值，相对灰度值与阳性表达强度成正比。

β细胞相对凋亡指数[3,4]：胰岛细胞凋亡指数/胰岛素阳性细胞核密度（胰岛细胞凋亡指数=胰岛凋亡细胞数/胰岛细胞总数。胰岛素阳性细胞核密度=阳性细胞核数量的平均值/阳性细胞面积的平均值）。

表1 3组大鼠胰岛表达胰岛素、Fasl相对灰度值及β细胞相对凋亡指数的比较（%）（$\bar{x}\pm s$）

时期	胰岛素相对灰度			Fasl相对灰度			β细胞相对凋亡指数		
	Con	DM	RSG	Con	DM	RSG	Con	DM	RSG
2周（n=4）	150.43±11.64	78.36±7.37●	94.27±9.36●▲	34.68±1.05	75.44±5.08●	69.01±4.87●▲	1.77±0.14	46.92±5.33●	34.64±6.75●▲
5周（n=4）	148.36±10.63	80.92±8.82●	119.52±11.72●▲	35.09±1.24	78.08±6.75●	53.56±4.55●▲	2.06±0.13	44.10±3.02●	20.53±5.04●▲
7周（n=4）	156.35±13.24	78.95±7.58●	134.62±10.25●▲	35.12±1.64	76.99±6.67●	48.39±7.39●▲	1.92±0.16	38.67±5.35●	11.63±3.88●▲
10周（n=4）	154.64±12.07	77.38±7.14●	143.54±12.33▲	34.89±1.23	81.92±5.84●	41.85±3.68●▲	2.03±0.14	38.78±6.51●	7.61±2.43●▲
13周（n=4）	157.23±12.34	82.47±7.38●	146.72±10.93▲	35.01±1.15	92.63±4.87●	36.81±6.75▲	2.04±0.17	36.65±6.41●	3.90±0.57▲

各指标中：，●，$P<0.05$ 与Con组相比；▲，$P<0.05$ 与DM组相比

1.5 统计分析

数据采用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行分析，所有指标均以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验，并进行 spearman 相关分析，以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 实验前各组动物之间有良好的同质性

注射 STZ 后 3 d，DM 及 RSG 两组大鼠表现出精神差、活动减少，多尿、多饮、多食，FBG 明显升高（>16.7 mmol/L）。表明造模成功。

2.2 胰岛中胰岛素、Fasl 因子的表达与 β 细胞相对凋亡指数检测结果

与 DM 组比较，RSG 经 RSG 治疗 2 周后，胰岛表达胰岛素的强度即胰岛素的相对灰度值逐渐增加，与 DM 组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）；Fasl 表达逐渐减少，实验结束时仅为 DM 组的 24.11%（$P<0.05$）；β 细胞相对凋亡指数减少，并随时间而逐渐进一步下降，与 DM 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）（见表 1）。

3 讨 论

本实验的研究对象是化学物质诱导糖尿病动物模型。因动物种属、繁殖条件及经济因素等，此模型一直受到实验研究的青睐。链脲佐菌素对实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性作用，可以使 SD 大鼠产生糖尿病。静脉或腹腔一次大剂量注射 STZ 直接破坏大量胰岛 β 细胞，诱发速发型糖尿病，接近于人类典型 1 型糖尿病的发病过程，血糖可稳定升高，动物多饮、多食、多尿明显，且模型制作操作方便、重复性好、成功率高，是制作 T1DM 大鼠模型较理想的方法[5]。

Butler 等[6]的研究表明，糖尿病中 β 细胞凋亡的增加程度超过了细胞复制的增加，导致 β 细胞数量下降，而且这种高水平的凋亡在糖尿病发病之前就已经开始出现，并贯穿于其发病的全过程。Fas/Fasl 通路是导致 β 细胞凋亡诸多通路[7]之一。当 Fas 与 FasL 以三聚体形式结合，启动半胱氨酸凋亡通路，可诱导表达 Fas 的细胞发生凋亡。理论上表达 Fasl 的 β 细胞与表达 Fas 的 T 细胞结合后，将导致该 T 细胞死亡，即 β 细胞保护自身不受 T 细胞的攻击。但是，Chervonsky 等[8]的研究结果表明，在 NOD 鼠的自身免疫性糖尿病起病过程中，CD8+T 细胞产生一种或多种因子，如穿孔素、TNF-α 等诱导 β 细胞表达 Fas 蛋白，Fas 阳性的 β 细胞与 Fasl 阳性的 β 细胞结合致 Fas 阳性的 β 细胞凋亡，β 细胞数量减少，最终导致自身免疫性糖尿病。本研究结果发现，在给 SD 大鼠注射 STZ 3 d 后，成模糖尿病大鼠胰岛 β 细胞表达 Fasl 的量远远大于正常对照组。经 RSG 干预 2 周后，Fasl 表达强度随时间而逐步减少；RSG 大鼠胰岛 β 细胞相对凋亡指数明显降低。由此可见，Fasl 在促发 β 细胞凋亡的过程中扮演了重要角色。RSG 可能通过减少 Fasl 的表达而阻止或延缓 β 细胞凋亡。

众多细胞因子参与 β 细胞凋亡，β 细胞凋亡途径组成了一个复杂的网络，近年来引起重视的内质网应激[9]、穿孔素、肿瘤坏死因子、NO、干扰素等因子均可导致 β 细胞凋亡。本研究仅从 Fas/Fasl 蛋白途径证明 RSG 能够阻止或延缓 β 细胞的凋亡，减少 β 细胞凋亡，改善胰岛功能。RSG 对 β 细胞凋亡的其他途径及其相互作用如何，尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Mandrup-Poulsen T.Beta cell death and protection[J].Ann N Y Acad Sci,2003,1005(1):32-42.

[2] 申 洪，陆药丹.免疫组织化学染色的定量方法研究[J].生物医学工程学杂志，1993，10(3)：281-284.

[3] 朱 波，薛耀明，李晨钟，等.罗格列酮对 OLETF 大鼠胰岛 β 细胞凋亡水平的影响[J].中国糖尿病杂志，2007，15(1)：44-46.

[4] 金惠铭，王建枝[M].病理生理学.第 6 版.北京：人民卫生出版社，2004.1-2.

[5] 吴清洪，顾为望，袁 进.链脲佐菌素诱导建立 1 型糖尿病大鼠模型[J].动物医学进展，2006，27(8)：114-116.

[6] Butler A E,Janson J,Walter C,et al.Increased β-cell apoptosis prevents adaptive increase in β-cell mass in mouse model of type 2 diabetes:evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid[J].Diabetes,2003,52(9):2304-2314.

[7] Lee S C,Pervaiz S.Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus[J].Int J Biochem Cell Biol,2007,39(3):497-504.

[8] Chervonsky A V,Wang Y,Wong F S,et al.The role of Fas in autoimmune diabetes[J].Cell,1997,89(1):17-24.

[9] Huang C,Haataja L,Gurlo T,et al.Induction of endoplasmic reticulum stress-induced β-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide[J].J Physiol Endocrinol Metab,2007,293(6):E1656-E1662.

（责任编辑：关蕴良）