维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0811-03

不同浓度α-生育酚对STZ诱导胰岛细胞抗氧化能力变化的影响

袁 英,方海立,侯爱莲

(重庆医科大学基础医学院生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察不同浓度 α-生育酚(α-tocopherol,α-T)对链脲菌素(Streptozotocin,STZ)引起的胰岛细胞活力、胰岛素分泌及抗氧化能力变化的影响。方法:用体外单层细胞培养的方法培养 1~3d Wistar 大鼠的胰岛细胞分为 4 组,经分组处理后采用 MTT、放射免疫等方法检测各组胰岛细胞活力、胰岛素分泌量、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)及 NO_2^-/NO_3^- 含量的变化。结果:STZ 可诱导胰岛细胞活力、T-AOC、SOD 活性明显减弱;胰岛素分泌量显著降低,从(186.78±6.78)降至(64.59±4.32);MDA 及 NO_2^-/NO_3^- 含量升高($P<0.05$);而 NOS 活性无明显改变($P>0.05$)。α-T 能有效抑制 STZ 引起的上述指标的变化(NOS 活性除外),该效应具有一定的剂量依赖性。结论:α-T 能够改善 STZ 对大鼠胰岛细胞的损伤,该效应可能与增强胰岛细胞清除自由基的能力有关,而与 NOS 活性的变化关系不大。

【关键词】α-生育酚;链脲菌素;胰岛细胞;抗氧化能力

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-11

Effects of different concentrations of α-tocopherol on streptozotocin-induced anti-oxidation competence in pancreatic islet cells

YUAN Ying, et al

(*Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition effects of different concentrations of α-tocopherol on pancreatic islet cell viability, insulin secretion, anti-oxidation competence induced by streptozotocin. *Methods*: Pancreatic islet cells from Wistar rats aged 1 to 3 days were cultured in monolayer in vitro. and divided into 4 groups. Then, cell viability, insulin secretion, T-AOC, SOD activity, MDA level, NOS activity and NO_2^-/NO_3^- production were measured by differrent detection methods. *Results*: Streptozotocin significantly decreased cell viability, T-AOC activity, SOD activity and insulin release level($P<0.05$), while increased MDA level, NO_2^-/NO_3^- production ($P<0.05$). These effects were blocked by α-tocopherol. The inhibition effects of α-tocopherol were shown in a dose-dependent fashion. Streptozotocin induced an indistinct change of NOS activity($P>0.05$), that could not be blocked by α-tocopherol. *Conclusion*: α-tocopherol can attenuate the damage of rats pancreatic islet cells induced by streptozotocin, the mechanisms of which may be that α-tocopherol can reinforce the competence of scavenging free radicals of pancreatic islet cells and not related to NOS activity change.

【Key words】 α-tocopherol; Streptozotocin; Islet cells; Anti-oxidation competence

糖尿病的发生与氧自由基生成过多或清除障碍造成胰岛细胞脂质过氧化损伤有关[1,2]。因此,研究具有抗脂质过氧化损伤作用的药物及其机制对于防治这类疾病具有十分重要的意义。α-T 是维生素 E 家族中的成员,具有较强抗氧化活性[3]。本文就 α-T 对体外培养大鼠胰岛细胞的影响及其作用机制做进一步探讨。

作者介绍:袁 英(1980-),女,硕士,
研究方向:胰岛细胞损伤与修复。
通讯作者:方海立,女,副教授,电话:023-68485069。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司)、链脲菌素及 V 型胶原酶(美国 Sigma 公司)、α-生育酚(d-α-tocopherol)(核工业北京化工冶金研究院);胰岛素放射免疫检测试剂盒(北京原子高科股份有限

维普资讯 http://www.cqvip.com

公司);总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);四甲基偶氮唑盐(上海华舜生物工程有限公司);二甲基亚砜(重庆东方试剂厂);清洁级 Wistar 乳鼠由本校实验动物中心提供。

1.2 胰岛细胞分离与培养

取出 1～3d 龄大鼠胰腺,剪碎,转入含胶原酶液的锥形瓶中,37℃消化呈细沙状,滤出细胞悬液,离心。用 0.4%台盼蓝染色,要求活细胞数 >90%。加入含 10%胎牛血清的 1640 培养液置 37℃培养箱中孵育 24h后换液,去除贴壁成纤维细胞。调整细胞浓度为 1×10^9 个/L,接种于培养板,分组进行实验。

1.3 实验分组

随机分为 4 组,各组设 6 个复孔:①正常对照组:培养的胰岛细胞不做任何干预处理;②α-T 组:培养液中加入 α-T (80mg/L),作用 24h。③损伤组:培养液中加入 STZ(0.58mg/L),作用 30min。④保护 A、B、C 及 D 组:培养液中加入 α-T,使终浓度分别为 10mg/L、20mg/L、40mg/L 及 80mg/L 作用 24h 后,再加入 0.58mg/L STZ 作用 30min。

1.4 MTT 法检测胰岛细胞活力

各组细胞离心(500r/min × 5min),弃上清液。每孔加入 200μl RPMI1640 培养液(不含血清)和 5mg/ml 的 MTT20μl,放入孵育箱中培养 4h。离心(1 000r/min × 10min),弃上清液。每孔加入二甲亚砜 200μl,振荡 5min 溶解结晶物。用全自动酶标仪测定 570nm 处吸光度(A)值进行比较。

1.5 胰岛素分泌量、T-AOC、SOD、MDA、NOS 及 NO_2^-/NO_3^-的检测

收集各组上清液,按各试剂盒操作说明进行检测。

1.6 统计学分析

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据用 SAS 软件进行统计分析,采用方差分析、q 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 不同培养条件下的胰岛细胞活力、胰岛素分泌量

损伤组 A 值和胰岛素分泌量显著低于正常对照组($P<0.05$);各保护组较损伤组两指标明显回升($P<0.05$);保护组(10、20、40mg/L)间 A 值、胰岛素分泌量差异显著($P<0.05$),呈剂量依赖性趋势;而高浓度组(40mg/L 与 80mg/L)间无明显差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 各组胰岛细胞活力、胰岛素分泌量($\bar{x}\pm s$,n=6)

分组	α-T(mg/L)	A 值	胰岛素分泌量(μU/ml)
正常对照	/	0.732 ± 0.011	186.78 ± 6.78
α-T	80	0.729 ± 0.012	178.42 ± 8.46
STZ	/	0.362 ± 0.013▲	64. 59 ± 4.32▲
A	10	0.523 ± 0.014*	92.47 ± 4.26*
B	20	0.584 ± 0.015*#	114.28 ± 6.42*#
C	40	0.663 ± 0.012**	138.62 ± 7.15**
D	80	0.652 ± 0.009*	130.44 ± 7.96*

▲$P<0.05$ 与正常对照组比较; *$P<0.05$ 与 STZ 组比较; #$P<0.05$ 与 A 比较; *$P<0.05$ 与 B 比较

表 2 各组 T-AOC、SOD 及 NOS 活性、MDA 及 NO 含量($\bar{x}\pm s$,n=6)

分组	α-T(mg/L)	T-AOC(U/ml)	SOD(U/ml)	MDA(nmol/L)	NOS(U/ml)	NO_2^-/NO_3^-(μmol/L)
正常对照	/	86.34 ± 4.12	23.14 ± 3.22	35.39 ± 2.46	7.68 ± 0.58	50.44 ± 8.62
α-T	80	87.65 ± 4.82	24.21 ± 1.32	35.13 ± 2.73	7.42 ± 0.73	48.65 ± 6.37
STZ	/	28.46 ± 2.15▲	3.45 ± 0.34▲	148.66 ± 7.42▲	8.04 ± 1.54	247.52 ± 15.03▲
A	10	35.23 ± 2.12*	10.44 ± 1.65*	102.69 ± 4.64*	7.86 ± 1.02	158.04 ± 10.82*
B	20	46.74 ± 3.06*#	14.52 ± 2.35*#	88.47 ± 3.56*#	8.07 ± 0.76	128.26 ± 11.57*#
C	40	69.28 ± 3.56**	16.83 ± 2.44**	68.47 ± 2.95**	8.22 ± 1.16	84.63 ± 7.57**
D	80	70.19 ± 2.62*	17.24 ± 3.05*	64.34 ± 2.82*	7.56 ± 0.99	88.19 ± 7.05*

▲$P<0.05$ 与正常对照组比较; *$P<0.05$ 与 STZ 组比较; #$P<0.05$ 与 A 比较; *$P<0.05$ 与 B 比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 T-AOC、SOD、NOS、MDA 及 NO_2^-/NO_3^- 的变化

损伤组较正常对照组 MDA 及 NO_2^-/NO_3^- 含量明显升高，T-AOC、SOD 活性明显降低($P<0.05$)；各保护组 T-AOC、SOD 活性、MDA 及 NO_2^-/NO_3^- 水平虽未恢复到正常对照组水平，但其下降或上升的程度较损伤组出现明显抑制；保护组(10、20、40mg/L)间上述指标差异显著($P<0.05$)，呈剂量依赖性趋势，而高浓度组(40mg/L 与 80mg/L)间无明显差异($P>0.05$)。各组间 NOS 活性无明显差异($P>0.05$)(表 2)。

3 讨 论

自由基参与多种生物活性物质的合成、异常细胞的吞噬及细菌杀灭等过程，对维持正常生命活动必不可少。但若自由基和过氧化脂质的产生与清除平衡严重失调，则会引起蛋白质、核酸等生物大分子结构和功能的改变，诱发各种疾病[4]。研究发现胰岛 β 细胞内抗氧化酶系含量较其他细胞少[5]，而细胞对自由基损伤的易感性取决于胞内抗氧化酶系的含量[6]，因而 β 细胞较其他细胞对氧化应激更为敏感，体内自由基产生过多或清除障碍更易导致 β 细胞损伤及糖尿病的发生[1,2]。

细胞总抗氧化能力主要是细胞外液中非酶促体系的抗氧化物质和酶促体系少数小分子抗氧化物质的总和，是反映组织抗氧化能力的重要指标之一。SOD 是存在于体内的一种重要的金属酶，能阻断自由基引发的一系列连锁反应，因而是清除自由基的关键酶，其活力的高低反映抗自由基的能力。MDA 是氧自由基作用于生物膜中多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化的主要代谢产物，能促使蛋白质合成能力下降或合成功能紊乱，其值的高低反应了受自由基攻击的程度。STZ 可选择性破坏大鼠胰岛 β 细胞[7]。在本实验中我们发现，加入 STZ 后，胰岛细胞活力、胰岛 β 细胞分泌功能明显受到抑制，STZ 损伤组中胰岛素含量较正常对照组明显减少。同时，细胞 T-AOC、SOD 活性明显降低，而 MDA 及 NO_2^-/NO_3^- 含量显著升高，提示 STZ 可通过抑制胰岛细胞总抗氧化能力、SOD 活性，导致自由基清除障碍、胰岛细胞生物膜脂质过氧化损伤。损伤组 NOS 的活性较正常对照组无明显改变，说明 STZ 诱导的胰岛细胞损伤可能与 NOS 活性变化无关。

α-T 是生物体内最重要的自由基清除剂之一，其色原烷醇环上含有羟基，具有还原性，极易与氧分子及自由基结合。通过自身被氧化成生育醌，从而将 ROO^- 转变为化学性质不活泼的 ROOH，阻断生物膜内黄嘌呤氧化酶(XO)反应链抑制脂质过氧化反应的启动和链传递，保护细胞结构免于氧化损伤[8]。本实验预先加入不同浓度 α-T 后，STZ 诱导的胰岛细胞活力、胰岛素分泌量降低程度受到明显抑制，并且在一定范围内抑制程度随药物浓度增加而增大，提示 α-T 能有效抑制 STZ 引起的胰岛细胞损伤，且该效应具有一定剂量依赖趋势。同时，我们还发现 α-T 保护组较损伤组细胞 T-AOC、SOD 活性明显回升，MDA、NO_2^-/NO_3^- 水平显著降低，该效应也具有一定剂量依从性。提示 α-T 可能通过增强胰岛细胞抗氧化性及清除自由基的能力，发挥胰岛功能保护效应。

参 考 文 献

[1] Fridlyand LE, Phipson LH. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanism in diabetes mellitus therapeutic approaches[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005; 1066(1): 136-151.

[2] Piro S, Anello M, Di Pietro C, et al. Chromic exposure to fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidation[J]. Metabolism, 2002; 51(10): 1340-1347.

[3] Zapolska-Downar D, Zapolskiq-Downar A, MarkiewskiM, et al. Selective inhibition by alpha-tocopherol of vacular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 274(3): 609-615.

[4] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007; 39(1): 44-84.

[5] Lenzen S, Lortz S, Drinkgern J, et al. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues[J]. Free Radic Biol Med, 1996; 20(3): 463-466.

[6] Elangovan V, Shohami E, Gati I, et al. Increased hepatic lipid soluable antioxidant capacity as compared to other organs of streptoztocin-induced diabetic rats: a cyclic voltammetry study[J]. Free Rad Res, 2002; 32(2): 125-134.

[7] Gunther L, Liu X, Neef H, et al. Glucagon expression shift in a syngeneic single-donor in trahepatic rat islet transplantation model[J]. Transplant Proc, 2005; 37(8): 3487-3489.

[8] Kapelusiak PM, Adamczewska GZ, Dorszewska J, et al. The protective action of alpha-tocopherol on the white matter lipids during moderate hypoxia in rats[J]. Folia Neuropathol, 2005; 43(2): 103-108.

(责任编辑：关蕴良)