维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0042-05

细胞因子诱导离体胰岛β细胞凋亡及其机理研究

余华荣,张 能,方海立,董毅龙

(重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF)和γ-干扰素(IFN-γ)引起胰岛细胞凋亡、胰岛素分泌、bcl-xl 和 bax 蛋白表达的变化。方法:应用体外单层培养的 3~5 天的 Wistar 大鼠胰岛细胞,分别检测 IL-1β、TNF 和 IFN-γ 对胰岛细胞凋亡细胞百分率、以及培养液中基础和高糖刺激下胰岛素分泌量、NO 含量、NOS 活性、bcl-xl 和 bax 蛋白表达以及 DNA 片段的影响。结果:IL-1β、TNF 和 IFN-γ 联合可诱导胰岛细胞凋亡率明显增加及 DNA 明显片段化,同时 NO 含量和 NOS 活性亦明显升高,胰岛素分泌明显降低,bcl-xl 表达下降和 bax 表达增强($P<0.01$),且有时间和剂量依赖性。结论:细胞因子能诱导胰岛细胞凋亡,其机制可能与提高 NOS 活性从而增加 NO 的生成以及上调 bax/bcl-xl 比例有关。

【关键词】白细胞介素-1β;细胞凋亡;一氧化氮;基因表达;胰岛细胞

【中国图书分类法分类号】R335 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-09

A study on apoptosis in isolated pancreatic islet cells induced cytokines and its mecanism

YU Huarong, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To investigate the apoptosis of isolated pancreatic islet cells and insulin secretion induced by combination of IL-1β, TNF and IFN-γ, and to investigate the mechanism of the change. *Methods*: Isolated pancreatic islet cells from Wistar rat were incubated in monolayer in vitro. NO production, NOS activity, insulin secretion, the protein expression of bcl-xl and bax, apoptotic rate of islet cells and DNA fragmentation in pancreatic islet cells incubated with combination of IL-1β, TNF and IFN-γ were measured. *Results*: Combination of IL-1β, TNF and IFN-γ induced a significant increase in apoptotic percentage of pancreatic islet cells, NO production and NOS activity, as well as DNA ladder appearance, while a decrease in insulin content. Up-regulation of the protein expression of bax and down-regulation of the protein expression of bcl-xl were also induced ($P<0.01$). These effects occurred in a time and dose dependent manner. *Conclusion*: The cytokines can induce β cell apoptosis, the mechanism of which may be the activation of NOS and the increase of NO production and the upregulation of bax/bcl-xl proportion.

【Key words】 Interleukin-1β; Apoptosis; Nitric oxide; Gene expression; Islet cell

1型糖尿病被认为是一种胰岛β进行性毁损、功能降低或丧失的遗传易感性自身免疫性疾病。其病理发生过程及其机理,国内外虽有大量文献报道[1],但迄今并未完全清楚,临床仍沿用经典胰岛素替代疗法,尚缺乏新的有效防治途径,与此无不有重要关系。

在免疫损伤过程中,过量的 IL-1β,TNF 和 IFN-γ 表达可诱导多种属来源的β细胞株发生大量凋亡[2]。但对胰岛直接作用的资料却不多。而上述细胞因子在诱导胰岛自身免疫损伤过程的主从关系亦存在争议[2,4,5]。本文用 Wistar 大鼠离体培养的原代β细胞作为实验对象,拟就上述细胞因子对β细胞凋亡的影响、凋亡相关基因 bcl-xL 和 bax 蛋白表达可能发生的变化作进一步探索,以期为 1 型糖尿病发生的病理学改变机理提供新的实验依据。

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(IFN-γ)均购于军事医学科学院基础医学研究所;

作者介绍:余华荣(1970-),男,讲师,硕士,
主要研究方向:内分泌生理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Hank's 液、RPMI-1640 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;一氧化氮(NO)检测试剂盒和一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;bcl-xL 抗体购于武汉博士德;bax 抗体购于美国 Santa Cruz 公司;即用型免疫组化通用试剂盒、DAB 显色剂、抗体稀释液为北京中山产品。3~5 天的 Wistar 大鼠乳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

出生 3~5 天的 Wistar 乳鼠,无菌取出胰腺,Hank's 液清洗后剪成 0.5 mm^3~1mm^3 大小,转入盛有胶原酶(2.0g/L)的锥形瓶中,37℃恒温水浴振荡消化 30min,150 目筛网过筛,离心(1000r/min)。加入含 10%胎牛血清 1640 培养液,置含 5% CO_2 培养箱内培养。24h 后换液,去除贴壁的成纤维细胞。再用 RPMI-1640 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 细胞形态学观察(光镜)

收集各种不同培养条件的细胞悬液,离心,培养液置-20℃冰箱保存备用。细胞进行涂片,用瑞氏染液染色,光镜下观察细胞形态并进行凋亡细胞计数。胰岛细胞出现胞浆浓缩,细胞核固缩、染色质凝同,沿核膜呈新月型、纤状改变或核碎裂、出现凋亡小体者为凋亡细胞。每玻片随机观察 200 个细胞,计算凋亡细胞百分率。

凋亡细胞百分率 = 凋亡阳性细胞数 /(正常细胞 + 凋亡细胞 + 坏死细胞数) × 100%

1.4 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 2h,电压 100V,DNA 分子量标准用 pBR322DNA/BstNI,电泳结束后在 1μg/ml 溴化乙锭中染色 30min,紫外透射分析仪下观察片段 DNA 梯度,并照相记录。

1.5 细胞培养液中胰岛素分泌量、NO 含量和 NOS 活性的测定

取收集的细胞培养液,用放射免疫法定量检测基础胰岛素分泌量和高糖(16.7mmol/L)刺激胰岛素分泌量;用 NO 和 NOS 检测试剂盒检测 NO 含量和 NOS 活性。

1.6 bcl-xL 和 bax 蛋白表达的变化

免疫组化检测 bcl-xL 和 bax 蛋白的表达。根据细胞着色强弱分为 4 个等级:无着色记 0 分、淡黄色记 1 分、棕黄色记 2 分、棕褐色记 3 分。按公式 HSCORE = $\sum Pi(i+1)$ (i = 0、1、2、3;Pi 表示评分为 i 的比例),计算 HSCORE 得分。

1.7 统计学处理

应用 SSPP10.0 for windows 统计软件处理,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,实验数据采用方差分析,组与组间比较用 t 检验,显著性水平 α 取 0.05。

2 结 果

预实验结果表明,取单一的上述三种细胞因子各 250U/ml 分别加入培养液中培养 48h、72h,未发现 β 细胞凋亡率明显的增加,DNA 电泳后为一大分子条带。而用三种细胞因子联合则凋亡细胞数明显增加,因此本实验重点观察了三种细胞因子的联合运用时对 β 细胞的作用结果。

2.1 不同浓度的细胞因子作用于胰岛 β 细胞后的变化

不同浓度的 IL-1β 与 TNF、IFN-γ 共同作用于胰岛 β 细胞后片段 DNA 梯度的变化 未加细胞因子的胰岛细胞 DNA 电泳后为一条大分子条带,加入三种细胞因子后的胰岛细胞 DNA 出现片段化倾向,并随细胞因子的浓度的增大逐渐明显(图 1)。

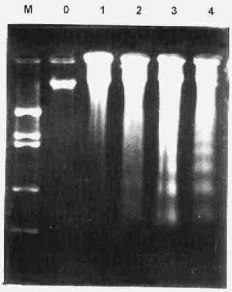


图 1 胰岛细胞受不同浓度细胞因子作用后的 DNA 电泳梯度

不同浓度的 IL-1β 与 TNF、IFN-γ 共同作用引起胰岛 β 细胞凋亡的百分率以及相应细胞培养液中 NO 含量、NOS 活性的变化 分别在细胞培养液中加入 25U/ml、50U/ml、75U/ml 和 100 U/ml 的 IL-1β 及 TNF、IFN-γ 各 250U/ml,孵育 24h 后,胰岛细胞凋亡百分率随 IL-1β 剂量的增加而逐渐增大,呈剂量依赖性表现,各组与正常对照组以及组间比较差异显著($P<0.01$);细胞培养液中 NO 的含量亦随 IL-1β 剂量的增高而明显增加,两组间比较有显著性差异($P<0.01$);与此相对应的培养液中 NOS 活性呈同步性增高,组间比较差异显著($P<0.01$)(表 1)。

bcl-xL 和 bax 蛋白表达的变化 正常对照组中胰岛细胞 bcl-xL 高表达 bax 低表达,加入细胞因子后,胰岛细胞 bcl-xL 表达降低而 bax 表达增强,与正常对照组相比有显著性差异($P<0.01$);并且随细

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度的 IL-1β 与 TNF、IFN-γ 共同作用引起的胰岛细胞凋亡率以及相应细胞培养液中胰岛素分泌量、NO 含量、NOS 活性的变化

分组(n=5)	细胞凋亡率 (%)	基础胰岛素分泌量 (μIU/ml)	高糖刺激胰岛素分泌量 (μIU/ml)	NO含量 (nmol/10⁶cells)	NOS活性 (U/10⁶cells)
正常对照组	4.0 ± 0.7	250 ± 19	410 ± 23	11.4 ± 3.0	1.5 ± 0.4
IL-1β 25U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	14.6 ± 0.8*	205 ± 14*	352 ± 17*	207 ± 28*	17.1 ± 1.7*
IL-1β 50U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	23.4 ± 1.1*△	162 ± 11*△	301 ± 16*△	422 ± 45*△	29.5 ± 2.9*△
IL-1β 75U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	30.2 ± 3.3*△	113 ± 11*△	229 ± 11*△	525 ± 46*△	34.4 ± 3.8*△
IL-1β 100U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	40.5 ± 5.7*△	80 ± 8*△	182 ± 12*△	613 ± 55*△	41.2 ± 3.8*△

*P<0.01 与对照组比较 △P<0.01 与上组比较

表 2 bcl-xL and bax HSCORE 评分 (n=5)

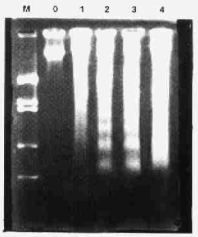
分 组	bcl-xL	bax
正常对照组	4.42 ± 0.78	1.64 ± 0.23
IL-1β 25U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	4.05 ± 0.65▲	1.78 ± 0.58▲
IL-1β 50U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	3.35 ± 0.65★	1.90 ± 0.59★
IL-1β 75U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	2.89 ± 0.57★	2.24 ± 0.62★
IL-1β 100U/ml+TNF250U/ml+IFN250U/ml	2.50 ± 0.51★	2.56 ± 0.75★

▲P<0.01 与正常对照组比较 ★P<0.01 与上一组比较

胞因子剂量的增加 bcl-xL 表达逐渐降低 bax 表达逐渐增强，各组差异有显著性，呈剂量依赖性（表 2）。

2.2 不同作用时间下细胞因子作用于胰岛 β 细胞后的变化

细胞因子对胰岛 β 细胞不同作用时间下的片段 DNA 电泳梯度 未加细胞因子的胰岛细胞培养 72h 后，提取 DNA 进行电泳呈现出一条大分子条带。取 IL-1β 50U/ml，TNF 与 IFN-γ 各 250U/ml 与培养细胞共同孵育后，见细胞的 DNA 呈现片断化倾向，并随时间的延长而变得更为明显，而 48h 后却呈瀑布状（图 2）。



M. molecular Marker
0.Normal control
1. 12 hours
2. 24 hours
3. 48 hours
4. 72 hours

图 2 胰岛细胞受细胞因子不同作用时间后的 DNA 电泳梯度

细胞因子对胰岛细胞不同作用时间后的 β 细胞凋亡百分率以及相应细胞培养液中胰岛素分泌量、NO 含量及 NOS 活性变化 以不加细胞因子的培养细胞组为正常对照组，加细胞因子（IL-1β 50U/ml，TNF 和 IFN-γ 各 250U/ml）者为损伤组，当作用时间分别为 12h、24h、48h 和 72h 时，损伤组中胰岛细胞的凋亡率随细胞因子作用时间的延长而逐渐增高，基础和高糖刺激的胰岛素水平却逐渐降低，且随细胞因子作用时间的延长而变化更为明显，呈时间依赖性关系，两相邻时间组间差异显著；48h 内细胞培养液中的 NO 含量随作用时间的延长而逐渐增加，这种增加有显著性差异；NOS 活性亦随之逐渐同步性增高，并有统计学意义。48h 后细胞培养液中的 NO 含量及 NOS 活性却无显著性变化（P > 0.05）（表 3）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 在 IL-1β50U/ml+TNF250U/ml+IFN-γ250U/ml 作用下，不同作用时间引起的胰岛细胞凋亡率、培养液中胰岛素水平、NO 含量和 NOS 活性

分组(n=5)	凋亡率（%）	NO含量（nmol/10⁶cells）	NOS活性（U/10⁶cells）	胰岛素基础分泌量（μIU/ml）	高糖刺激胰岛素分泌量（μIU/ml）
control group	3.7 ± 0.5	10.5 ± 2.4	1.6 ± 0.5	280 ± 19	401 ± 21
12h	10.5 ± 0.9△	175 ± 34△	13.7 ± 1.2△	237 ± 15△	360 ± 16△
24h	25.6 ± 1.3△	263 ± 32△	18.6 ± 1.3△	182 ± 10△	321 ± 14△
48h	35.2 ± 2.4△	443 ± 67△	29.9 ± 3.1△	117 ± 11△	259 ± 12△
72h	46.3 ± 4.2△	452 ± 71#	30.3 ± 3.9#	77 ± 9△	172 ± 9△

△P<0.01 与上一组比较 #P>0.05 与 48h 组比较

bcl-xL 和 bax 蛋白表达的变化 正常对照组中胰岛细胞 bcl-xL 呈高表达 bax 低表达，加入细胞因子后，胰岛细胞 bcl-xL 表达降低而 bax 表达增强，与正常对照组相比有显著性差异（P<0.01）；并且随细胞因子作用时间的延长加 bcl-xL 表达逐渐降低 bax 表达逐渐增强，各组差异有显著性，呈时间依赖性（表 4）。

表 4 bcl-xL and bax HSCORE 评分(n=5)

group	bcl-xL	bax
0h	3.44 ± 0.77	1.64 ± 0.46
12h	3.15 ± 0.63▲	1.87 ± 0.54▲
24h	2.89 ± 0.62★	1.99 ± 0.54★
48h	2.75 ± 0.55★	2.24 ± 0.63★
72h	2.43 ± 0.45★	2.57 ± 0.70★

▲P<0.01 与正常对照组比较

★P<0.01 与上一组比较

3 讨 论

1 型糖尿病被认为是一种以胰岛初始的炎症反应及其内或周围细胞浸润为特征的遗传易感性自身免疫性疾病。浸润的炎症细胞释放过量的细胞因子 IL-1β、TNF 和 IFN-γ 能诱导 β 细胞凋亡，其中 IL-1β 起着主要的直接作用[1,2]。有报道证明，仅有 TNF 和 IFN-γ 存在，并不能使纯化的 β 细胞[3]、RIN 细胞株细胞[4,5]发生凋亡，但可诱导胰岛中的巨噬细胞和内皮细胞释放 IL-1β，进而导致 β 细胞凋亡。本实验在原代培养 Wistar 大鼠的胰岛细胞中证明，单独运用上述三种细胞因子，无论剂量大小或作用时间长短均未见到 β 细胞凋亡的明显增加。而三种细胞因子联合作用于胰岛细胞后，则 β 细胞大量凋亡。其真正的原因尚无定论，还有待进一步的探讨。

IL-1β 等细胞因子对胰岛 β 细胞具有选择性毒性作用[6-8]，即胰岛细胞中只有 β 细胞对上述细胞因子的作用敏感，而其它的细胞如 α 细胞、δ 细胞等对其作用不敏感。可能的原因是细胞因子能诱导 β 细胞中 iNOS 的表达，而 iNOS 在胰岛非 β 细胞中却不能被诱导[9,10]。因此，本实验用胰岛细胞总的凋亡率代表胰岛 β 细胞的凋亡率。

细胞因子对胰岛 β 细胞的作用效应与其剂量及作用时间密切相关。一般低剂量（1~3U/ml）、短时程（1~5h）对胰岛无明显损伤作用，并能促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌[11]。但随着剂量的增大和作用时间的延长，细胞因子则会引起 β 细胞超微结构损伤和破坏、凋亡。我们的实验结果表明在 IL-1β 取 50U/ml，TNF 和 IFN-γ 分别取 250U/ml，12h 后即可诱导胰岛细胞的凋亡开始增加，并且呈现明显的时间与剂量依从性。表现为细胞 DNA 电泳片段梯度逐渐明显，凋亡细胞百分率逐渐增加，具有显著的统计学意义。需要提出的一个现象是，在 48h 后 DNA 电泳渐呈瀑布状，无明显的梯度，而此时细胞凋亡率仍相应增加，出现这一现象可能是由于随细胞因子作用时间的延长细胞因子引起 β 细胞凋亡增加的同时，其坏死数量亦在逐渐增多，增多的坏死细胞 DNA 碎片掩盖了凋亡细胞的 DNA 梯度。

有实验表明细胞因子诱导胰岛细胞凋亡可能是通过代谢过程中生成的一种氧自由基——一氧化氮（Nitric Oxide, NO）所引起的。本实验进一步证明了细胞因子浓度的增加、胰岛细胞凋亡率的增加以及 NO 含量的增加三者有密切相关性，同时发现

维普资讯 http://www.cqvip.com

NO增加的细胞培养液中 NOS 的活性也随之增高，提示细胞因子是通过提高 NOS 的活性而引起 NO 增高是导致胰岛细胞凋亡的途径之一。本实验还观察到细胞因子作用时间延长到 48h 以后，NO 含量及 NOS 活性的增加并不明显，但此时胰岛细胞凋亡数却仍然在增加。提示随着作用时间的延长，细胞因子引起胰岛凋亡的介质除了 NO 外，可能还有其它介质的参与，譬如过氧化氢等[12]。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡调控中重要的凋亡基因，在细胞凋亡信号转导中发挥重要功能。目前该家族已发现 20 多个成员，按功能可分为抗凋亡成员如 bcl-2，bcl-xL，bcl-w 等，以及促凋亡成员 bax，bak，bad 等，其中 bcl-xL 和 bax 是其家族中最具代表性的两个成员。Bax 是重要的异二聚体伴分子，与 bcl-xL 共存于线粒体，bax 可与 bcl-xL 构成异二聚体，而 bax 自身也可组成同二聚体诱导凋亡。bcl-xL 必须结合 bax 才能发挥其作用，bcl-xL 的过度表达与 bax 形成异二聚体而阻抑凋亡[13]。在本实验中发现，使用 IL-1β、TNF 和 IFN-γ 后，β 细胞发生大量凋亡的同时，bcl-xL 表达降低，bax 的表达增强，具有明显的时间和剂量依赖性。提示在细胞因子诱导胰岛 β 细胞凋亡过程中 Bcl-2 基因家族成员可能是一类重要的调节因子。

参 考 文 献

[1] Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, et al. beta cell apoptosis in cell-mediated autoimmune [J]. diabetes.Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94:213-218.

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

[3] Corbett JA, Mcdaniel ML. Intra islet release of interleukin 1 induces β-cell function by inducing β-cell expression of inducible nitric oxide synthase[J]. J Exp Med, 1995;181:559-568.

[4] Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF-alpha and IFN- gamma poteniate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide [J]. Cytokin, 1994;6:399-406.

[5] Flodstrom M, Niemann A, Bedoya FJ, et al. Expression of the citrulline nitric oxide cycle in rodent and human pancreatic beta-cells:induction of argininosuccinate synthase by cytokines [J]. Endocrinology, 1995;136:3200-3206.

[6] Mandrup-Poulson T, Egeberg J. Ultrastructural study of time-course and cellular specificity of interleukin-1 mediated islet cytotoxicity [J]. APMIS, 1987;95:55-63.

[7] Sandler S, Bendtzen K. Studies on the mechanism causing insulin secretion in rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1β indicate a perturbation in the mitochondrial function [J]. Endocrinology, 1989;124:1492-1501

[8] Helqvist S, Zumsteg VW, Spinas GA, et al. Repetitive exposure of pancreatic islets to interleukin-1β.An in vitro model of pre-diabetis[J]? Autoimmunity, 1991;10:311-318.

[9] Corbett JA, Wang JL. Interleukin-1β induces the formation of nitric oxide by β-cells purified from rodent islets of langerhans:Evidence for the β cell as a soure and site of action of nitric oxide[J]. J Clin Invest, 1992;90:2384-2391.

[10] Strandell E, Buschard K. Interleukin-1β induce the expression of Hsp70, hemeoxygenase and Mn-SOD in FACS-puri-fied rat islet β-cells, but not in α-cells[J]. Immunol Lett, 1995;48:145-148.

[11] 钟慈声，孙安阳. 一氧化氮的生物医学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1997;266.

[12] Sumoski W, Baquerizo H, Rabinovitch A. Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines[J]. Diabetologia, 1989;32:792-796.

[13] 严瑞兰，王剑波，惠宏襄，等. 促凋亡基因 bax 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及意义[J]. 第四军医大学学报，1998;19(3):322-324.

更 正 说 明

2005年第 6 期第 837 页图 1 应为下图，特此更正。

