维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2001)04－0378－04

# 牛磺酸对细胞因子诱导的胰岛细胞凋亡的影响

余华荣,张　能,方海立

(重庆医科大学基础医学院生理教研室　重庆　400016)

【摘　要】目的:观察牛磺酸对白细胞介素－1β(IL－1β)、肿瘤坏死因子(TNF)和γ－干扰素(IFN－γ)诱导的胰岛细胞凋亡的影响。方法:应用体外单层培养的 Wistar 大鼠胰岛细胞,分别检测 IL－1β、TNF 和 IFN－γ 以及牛磺酸对胰岛细胞凋亡细胞百分率,培养液中 NO 含量及 NOS 活性以及 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及 DNA 片段明显增加,同时 NO 含量和 NOS 活性亦明显升高($P<0.01$);牛磺酸能阻断上述细胞因子的作用($P<0.01$),且有剂量依赖性。结论:NO 可能是介导上述细胞因子引起胰岛细胞凋亡的重要途径之一。牛磺酸能够改善细胞因子诱导的胰岛细胞凋亡,其机制可能与抑制 NOS 活性从而减少 NO 的生成有关。

【关键词】白细胞介素－1β;细胞凋亡;一氧化氮;牛磺酸;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】2001－03－23

# The influence of taurine on IL－1β, TNF and IFN－γ induced apoptosis of rat pancreatic islet cells

*YU Hua－rong, et al*

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

【Abstract】 ***Objective***: To observe the role of taurine on apoptosis of isolated pancreatic islet cells induced by combination of IL－1β, TNF and IFN－γ. ***Methods***: Isolated pancreatic islet cells from Wistar rat were incubated in monolayer in vitro. NO production, NOS activity, apoptotic percentage of islet cells and DNA fragmentation in pancreatic islet cells incubated with combination of IL－1β, TNF and IFN－γ, taurine were measured. ***Results***: Combination of IL－1β, TNF and IFN－γ could induce a significant increase in apoptotic percentage of pancreatic islet cells and DNA fragmentation. NO production and NOS activity also markedly increased ($P<0.01$), which were blocked by addition of taurine to the pancreatic islet cells ($P<0.01$). ***Conclusion***: NO might be one of the important ways of inducing apoptotic cell death of pancreatic islet cells by a combination of IL－1β, TNF and IFN－γ. Taurine attenuates the cytokines－induced β cells apoptosis, the mechanism of which may be the inhibition of NOS and the decreasing of NO production.

【Key words】 Interleukin－1β; Apoptotic cell death; Nitric oxide; Taurine; Islet cell.

牛磺酸(Taurine)是体内含量丰富的含磺酸基β自由氨基酸,不仅对维持机体正常的生命功能有重要作用[1],而且具有对抗多种细胞损伤的细胞保护功能[2]。近年来研究发现,牛磺酸具有胰岛素样生物效应[3]。此前,我们的工作亦证明,牛磺酸能反转白细胞介素 1－β 引起的胰岛素分泌抑制,并对链脲佐霉素(Streptozotocin, STZ)糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤具有明显的保护作用[4,5]。本工作进一步观察了牛磺酸对细胞因子诱导的胰岛细胞凋亡的影响,并对其作用机理作一初步探讨。

作者介绍:余华荣(1970－　),男,讲师,硕士,重庆丰都人,主要研究方向:胰岛细胞保护

## 1　材料与方法

1.1　材料　白细胞介素－1β(IL－1β),肿瘤坏死因子(TNF)和γ－干扰素(IFN－γ)(军事医学科学院基础医学研究所);牛磺酸:(分析纯)(南京制药厂);Hank′S 液,RPMI－1640 培养液(GIBCO 公司);小牛血清(成都华西生物制品研究所);胶原酶 V 型(Sigma 公司);pBR322DNA/BstNI Markers(北方同正公司);一氧化氮(NO)检测试剂盒和一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。Wistar

维普资讯 http://www.cqvip.com



大鼠由本校实验动物中心供给。

1.2 Wistar 大鼠的胰岛细胞分离与培养

1.2.1 胰岛的分离 选用 200～300g 成年雄性 Wistar 大鼠，乙醚麻醉后，腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠(2.5ml/kg 体重)维持，然后仰卧固定。腹部皮肤常规消毒，通透打开左侧腹腔，结扎腹主动脉上端，沿脾动脉剪取胰腺体尾部分，立即浸入 4℃ Hank'S 液中，清洗 2 次，去除脂肪、淋巴结。然后将胰腺剪成小于 $1mm^3$ 的小块，转入盛有 6ml 含 12mg 胶原酶的锥形瓶中，放入恒温摇床中，37℃ 保温，摇床转速 200r/min，每 10min 用巴氏吸管吹打一次，30min 胰腺已完全散成腺泡悬液，将该悬液在装 4℃ Hank'S 液的离心管中连续自然沉降 6 次，前三次各沉降 90s，后三次各沉降 60s，最后剩下的为夹杂有少量腺泡团的胰岛。在黑背景的解剖显微镜下，胰岛呈圆形或椭圆形，直径 200～300μm 呈灰色或棕黄色，将胰岛用玻管挑出。

1.2.2 胰岛分散成单细胞 把所有的胰岛加在不含 $Ca^{2+}$、$Mg^{2+}$ 的 Hank'S 液中，其中含有 3mMEGTA，20mg/ml BSA，2mg/ml 葡萄糖和胰蛋白酶 2.5mg/ml，最终稀释度为 30μl/ml，在 37℃ 5% $CO_2$ 孵箱中孵育 10min，随后用玻管吹打，使之被分散成单细胞，用尼龙网过滤，收集胰岛细胞。用 Hank'S 液清洗，离心。加含 15% 小牛血清的 1640 培养基，制成细胞悬液，经 $CO_2$ 孵箱内孵育 18h 后，去除成纤维细胞，收集胰岛细胞重新清洗，制成新的细胞悬液，调节细胞浓度至 $1\times10^6$/ml，置 24 孔培养板内培养。

1.2.3 细胞形态学观察(光镜) 收集各种不同培养条件培养后的细胞悬液，离心，置培养液于 -20℃ 冰箱中保存备用。把收集到的细胞进行涂片，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，染色质凝固，沿核膜呈新月型、杆状改变或核碎裂、出现凋亡小体者为凋亡细胞。每玻片观察 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%

1.2.4 DNA 片断观察 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。

1.2.5 细胞培养液中 NO 的检测 用 NO 检测试剂盒(硝酸还原酶法)检测，步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.2.6 细胞培养液中 NOS 活性的检测：用 NOS 检测试剂盒检测，步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.2.7 统计学处理 实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，实验数据采用完全随机设计的方差分析，组与组间比较用 $q$ 检验，显著性水平 $\alpha$ 取 0.05。

## 2 结 果

2.1 胰岛细胞凋亡百分率、细胞培养液中 NO 含量和 NOS 活性的变化

以不加细胞因子及牛磺酸的培养胰岛细胞组为正常对照组，加入细胞因子(IL－1β75U/ml + TNF250U/ml + IFN－γ250U/ml)者为损伤组，同时加入牛磺酸与细胞因子(浓度同损伤组)为保护组。各组胰岛细胞孵育 24h 后，进行凋亡细胞计数并测定各组培养液中 NO 含量及 NOS 活性。结果表明，损伤组较正常对照组细胞凋亡率、NO 含量及 NOS 活性均有显著增高，而保护组的上述指标较损伤组则发生明显降低，且与牛磺酸浓度具有一定的量效关系。经统计学分析差异显著($P<0.01$)(见表 1)。

表 1 牛磺酸对细胞因子引起的胰岛细胞凋亡百分率($\bar{x} \pm s$)%、培养液中 NO 含量(nmol/细胞)及 NOS 活性的影响

| 分组($n=5$) | 凋亡细胞百分率(%) | NO 含量(nmol/$10^6$cell) | NOS 活性(U/$10^6$cell) |
|---|---|---|---|
| Normal control | 3.5±0.6 | 10.3±1.5 | 1.1±0.3 |
| IL－1β75U/ml + TNF250U/ml + IFN－γ250U/ml | 31.2±3.7*△ | 503±35*△ | 32.9±3.2*△ |
| Tau5mmol/L + IL－1β75U/ml + TNF250U/ml + IFN－γ250U/ml | 17.1±1.2*△ | 263±28*△ | 19.0±1.9*△ |
| Tau10mmol/L + IL－1β75U/ml + TNF250U./ml + IFN－γ250U/ml | 10.2±0.7*△ | 158±23*△ | 12.3±1.3*△ |

注：与正常对照组相比 * $P<0.01$ 与前一组相比△ $P<0.01$

2.2 不同培养条件下的胰岛细胞 DNA 电泳

如图 1 正常对照组中胰岛细胞 DNA 电泳后为一大分条带。单独加入细胞因子 IL－1β75U/ml，TNF 和 IFN－γ 各 250U/ml 的损伤组中可见 DNA 明显片断化。而同时加入了牛磺酸的保护组中，DNA 片段减少且变得模糊，并且牛磺酸浓度越高，胰岛细胞 DNA 片断化倾向越小。

维普资讯 http://www.cqvip.com



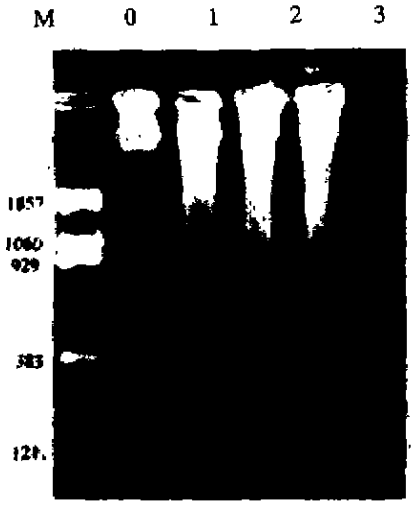



**图 1 牛磺酸处理前后胰岛细胞 DNA 电泳**

**M 为分子量标准 Marker(pBR322 DNA/BstNI),0、1、2、3 分别为正常对照组、损伤组、牛磺酸 5mmol/L 和 20mmol/L 的保护组**

## 3 讨 论

1 型糖尿病最终表现为胰岛 β 细胞渐进性死亡,胰岛素分泌枯竭,导致以糖代谢为主的物质代谢障碍。因此,目前临床上治疗 1 型糖尿病的主要方法是通过注射胰岛素来补充体内胰岛素的不足。尽管该方法有效,但是给病人带来终身治疗的痛苦。因此,人们一直在寻找治疗 1 型糖尿病新的方法,譬如胰岛移植及药物治疗等。随着进一步对 NO 在 1 型糖尿病发病机制中所占重要地位的认识,那些能减少 NO 的生成以及清除体内 NO 的药物逐渐引起人们的重视。上个世纪八十年代末,发现由 IL-1 和 TNF 在一种突变(transgenie)小鼠(NDD 小鼠)造成的胰岛 β 细胞损伤,可以被自由基清除剂缓解,但是,自由基清除剂对其他动物作用并不明显[6]。后来人们应用 NOS 抑制剂 NAME(L-硝基-精氨酸甲酯)和 NMME(L-单甲基-精氨酸)能够减轻胰岛 β 细胞损伤和凋亡[7,8],并能预防链佐霉素引起的自发免疫性糖尿病[9]。但是 NAME 和 NMME 应用于临床却存在着很大的障碍。最近,一些新的 NO 合酶抑制剂氨基胍(aminoguanidine)被发现可选择地抑制 iNOS 而减轻胰岛 β 细胞凋亡。但是在实验动物中,高剂量氨基胍仍可耐受,而且慢性用药时,由于其水解后生成半卡巴腙(semicarbazide)和肼(hydrazine)有毒性作用[10],因此仍然无法应用于临床治疗。

牛磺酸即 2-氨基乙磺酸($H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H$),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。近年来研究发现,牛磺酸具有多种途径的细胞保护功能,包括:维持细胞内外渗透压平衡、直接稳膜作用、调节细胞钙稳态、清除自由基、抗脂质过氧化损伤等[11],对多种疾病具有防治前景,因此日益受到重视。

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[3],但对胰岛 β 细胞的保护作用迄今报道并不多见,上个世纪 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[12]。在 STZ 诱导的 IDDM 动物模型上,预防性应用牛磺酸可明显降低动物血糖水平,增加骨骼肌、心肌糖含量,促进糖原合成与糖酵解[12]。Tokunaga 等[13]也发现运用牛磺酸治疗的 STZ 糖尿病 ddy 或 CD-1 小鼠,不仅可纠正动物的高血糖水平,亦可抑制血浆胰岛素水平的下降。组织学检查也显示,牛磺酸治疗组小鼠胰岛 β 细胞变性坏死的程度明显低于对照组。但并未引起更多学者们的广泛关注和深入探讨。此前我们利用 STZ 糖尿病大鼠研究亦得到相同的结果[5]。本文运用直接诱导 1 型糖尿病的细胞因子作用于离体培养的 Wistar 成年大鼠胰岛细胞,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

维普资讯 http://www.cqvip.com



显著低于损伤组，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，并且该作用具有一定的剂量依从关系。

有关牛磺酸对细胞凋亡的保护机理，有报道认为牛磺酸是一种抗氧化剂，它能改善肝细胞、内皮细胞的凋亡和坏死。其中一条作用途径可能是牛磺酸作用于 NOS 的 mRNA 水平，从而影响 NO 的生成[14~16]。而牛磺酸对胰岛 β 细胞凋亡的保护机理至今尚未报道。本文结果提示，细胞因子诱导胰岛 β 细胞损伤凋亡，主要是通过细胞内 NOS 激活而大量 NO 生成所致的毒性作用介导。而运用牛磺酸后的保护组细胞培养液中 NO 含量与 NOS 活性均较单纯损伤组有明显降低，并随牛磺酸浓度的增加而降低更为显著，具有统计学意义。表明牛磺酸对抗细胞因子诱导胰岛 β 细胞凋亡，可能主要是通过抑制 NOS 活性，减少细胞内 NO 生成，从而减轻 NO 对 β 细胞的毒性作用而实现的。

## 参 考 文 献


[1] Wright CE, Hallan HH, Lin YY. Taurine: Biological update [J]. Annu Rev Biochem, 1985; 55: 427.

[2] 苏静怡，唐朝枢. 心血管系统的细胞保护[J]. 基础医学与临床，1994；14：86.

[3] 杨 军，田 青. 牛磺酸与糖尿病[J]. 国外医学(内分泌分册)，1995；15(1)：8－11.

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

[5] 张 能，方海立，张 徽，等. 链佐霉素糖尿病大鼠胰岛损伤及牛磺酸对损伤保护的病理形态免疫组化研究[J]. 重庆医科大学学报，1997；3：203－206.

[6] Oberley LW. Free radicals and diabetes [J]. Free Radical Biol Med, 1988; 5: 113.

[7] Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA, et al. Tumor necrosis factor－α and inferon－γ inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned－rat islets [J]. Diabetes, 1996; 45: 183－189.

[8] Dunger A, Augstein P, Schmidt S, et al. Indentification of interleukin 1－induced apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmeted DNA [J]. J Autoimmun, 1996; 9: 309－313.

[9] Mendola J, Wright JR, Lacy PE. Oxygen free radical scarengers and immune destruction o f murine islets in allograft rejection and multiple low－dose streptozotocin－induced insulitis [J]. Diabetes, 1989; 38: 379.

[10] 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，1996；149.

[11] 刘庆德，唐朝枢，苏静怡. 牛磺酸的生物学效应[J]. 国外医学 生理病理与临床分册，1991；11(1)：3－6.

[12] Goodman HO, Shihabi ZK. Supplemental taurine in diabetics rats: effects on plasma glucose and triglycerides [J]. Biochem Med Metab Biol, 1990; 43(1): 1－9.

[13] Tokunaga F, Yoneday Y, Xuriyama. Protective action of taruine against streptozotocin－induced hyperglycemia [J] Biochem Pharmacol, 1979; 28: 2807.

[14] Radmond HP, Wang JH, Bouchier－Hayes D, et al. Taurine attenuates nitric oxide and reactive oxygen intermediate－dependent hepatocyte injury [J]. Arch Surg, 1996; 131: 1280－1287.

[15] Wang JH, Redmond HP, Wasten RWG, et al. The benefical effect of taurine on the prevention of human endothelial cell death [J]. Shock, 1996; 6: 331－338.

[16] Wang JH, Redmond HP, Wasten RWG, et al. Taurine protects against sodium arsenite－induced human endothelial cell apoptosis [J]. Surg Form, 1995; 81: 661－664.