DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.019
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1428 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1428-02

内毒素对大鼠胰岛细胞凋亡及其意义的研究

李 强[1],许霖水[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院检验科,重庆 400037;[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内毒素对大鼠胰岛细胞凋亡作用的意义。方法 采用单细胞凝胶电泳和DNA凝胶电泳技术,分析外源NO供体(硝普钠)和LPS对离体胰岛细胞的凋亡及胰岛素合成与分泌的影响。结果 体外试验显示,外源NO明显引起胰岛细胞DNA断裂,出现慧星尾和凋亡梯状带,并呈剂量依赖关系。高浓度NO(60 mmol/L SNP)可引起胰岛细胞DNA随机降解。外源NO强烈抑制葡萄糖刺激β-细胞的胰岛素合成与分泌。LPS离体条件下,对胰岛细胞凋亡作用不明显。结论 LPS通过整体作用诱导炎症细胞和胰岛细胞iNOS表达,产生NO介导胰岛细胞凋亡,从而抑制胰岛素合成与分泌。

关键词:内毒素;一氧化氮;胰岛细胞;凋亡;胰岛素分泌
中图法分类号:Q578;R644 文献标识码:A

Studies on the effets of endotoxin on apoptosis of rat pancreatic islet cells and their significance

LI Qiang, XU Lin-shui (Department of Biochemistry, Third Military Meical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the significance of the effects of endotoxin (LPS) on apoptosis of pancreatic islet cells in rats. Methods DNA damage of islet β-cells in rats by the external donor of NO (sodium nirtoprusside) and LPS in vitro with single cell gel electrophoresis and DNA agarose gel electrophresis were observed, the synthesis and secredtion of insulin under high glucose stimulation were also evaluated. Results *In vitro* experiment showed that exogenous NO markedly cause the damage of DNA and strongly inhibited the high glucose-stimulated insulin synthesis and secretion in islet β-cells, but LPS did not exert the same effect. Conclusion The mechanism of the effcts of endotoxin on apoptosis of islet β-cells might be stimulating the expression of iNOS in inflammatory or non-inflammatory risident islet cells that generates the NO inducing the DNA damage and the dysfunction of islet cells.

Key words: endotoxin; NO; islet cells; apoptosis

最近Arnush等[1]报道,用TNFα+LPS+IFNγ处理新鲜分离的人和大鼠胰岛,可使居留(Resident)于胰岛的巨噬细胞活化,产生内源性IL-1,选择性引起β细胞功能损害,直接参与自身免疫性糖尿病的发生。但有关内毒素是否可单独直接引起胰岛细胞损伤或凋亡未见直接报道。本研究拟观察LPS诱导大鼠胰岛细胞凋亡作用,探讨内毒素对胰岛细胞凋亡及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

脂多糖(LPS, *E. coli* O127:B8)、胶原酶(Ⅴ型)、蛋白酶K、低熔点及常熔点琼脂糖,皆为Sigma公司产品;抗胰岛素抗体,由华西糖尿病研究所提供;硝普钠,购自北京刘李店化公厂;小分子量DNA标准,购自上海夏华公司,其余试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胰岛细胞分离及鉴定 取Wistar大鼠,按文献[2]方法分离和纯化胰岛,用抗胰岛素抗体免疫组化染色鉴定,胰岛纯度>80%。

1.2.2 胰岛细胞凋亡检测 同文献[2]方法,作琼脂糖凝胶单细胞电泳,测定细胞损伤度(慧星试验),用2%琼脂糖凝胶进行DNA电泳,检测凋亡带。

1.2.3 外源NO对离体细胞胰岛素合成与分泌的影响 按文献[2]方法制备大鼠胰岛细胞。称取48份胰岛细胞,分别置于48孔培养板中。对照组每孔加1.0 ml含20 mmol/L葡萄糖的RPMI 1640培养液;实验组加1.0 ml含20 mmol/L葡萄糖和20 mmol/L硝普钠(Sodium nihoprusside, SNP)的RPMI 1640培养液。分别置于CO_2孵箱37 ℃孵育。分别于30、60、90、120 min收集上述各孔上清液,胰岛细胞制成匀浆,用Lowry法定蛋白。取匀浆和上清液分别测定胰岛素含量,以mU/g表示。上清液胰岛素代表分泌量,匀浆加上清胰岛素代表合成量。

1.2.4 统计学处理 结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 NO和LPS致胰岛细胞凋亡的比较

不同浓度硝普钠(NO供体)体外作用胰岛细胞,与对照组比较,细胞凋亡(迁移度)和DNA损伤度均显著增加,DNA凝胶电泳出现明显的凋亡梯状带,并呈剂量依赖关系见图1,2。另外,5、10 μg/ml LPS在同样条件下对胰岛细胞凋亡作用不明显。

2.2 外源NO对大鼠胰岛素合成和分泌的影响

正常大鼠胰岛细胞在高糖刺激下,胰岛素的合成与分泌依

作者简介:李 强(1971—),男,重庆大足县人,硕士,讲师,主要从事创伤代谢调控方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2001-01-10;修回日期:2001-05-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

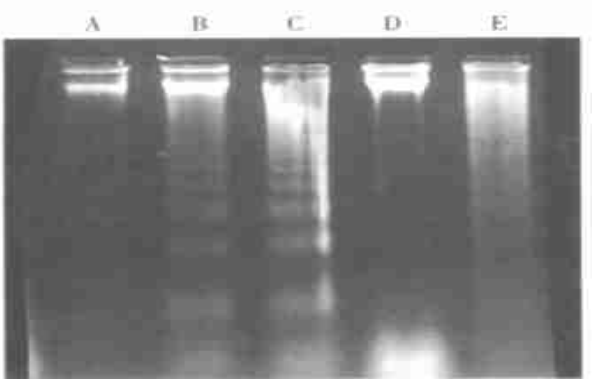
时间直线上升。但当有NO(SNP供体)存在下,高糖刺激的胰岛素合成与分泌依时间增加的斜率明显低于对照组。而且胰岛细胞的胰岛素(合成)则依时间而降低。说明外源NO减少胰岛素分泌的同时亦抑制胰岛素合成,见表1。

表 1　NO 对高糖刺激胰岛素合成和分泌的影响(mU/g, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of NO on synthesis and secretion of insulin in pancreas by high glucose stimulation (mU/g $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Supernatant		Pancease		Total synthesis	
		Control	SNP added	Control	SNP added	Control	SNP added
30 min	6	63.39±2.51	38.76±1.44 *	22.83±1.17	21.58±0.41	86.22±2.31	60.33±1.62 *
60 min	6	87.82±1.87	52.21±2.21 *	21.06±2.63	16.59±0.75 *	108.88±1.65	68.79±2.77 *
90 min	6	113.30±5.68	61.12±6.54 *	17.34±2.22	13.94±1.45 *	129.89±5.23	75.06±7.02 *

*: $P<0.01$ *vs* control



A: Control; B: 20 mmol/L SNP; C: 40 mmol/L SNP; D: 10 μg/ml LPS; E: 60 mmol/L SNP

图 1　LPS 和 SNP 致胰岛细胞 DNA 损伤

Fig 1　Comparison of SNP and Cps on DNA damage in islet β-cell

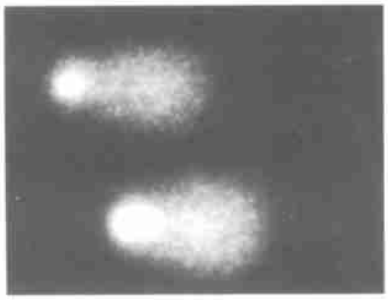


图 2　SNP 致胰岛细胞核 DNA 慧星图

Fig 2　Comets of nuclear DNA damage in islet β-cells by SNP (SNP 20 mmol/L)

3　讨论

近来许多研究证明,IL-1β、TNFα 和 IFNγ 等致炎细胞因子刺激巨噬细胞 iNOS 表达,产生的 NO 可特异性介导胰岛β-细胞调亡和功能损害是胰岛素依赖性糖尿病的重要发病因素[4,5]。但是有关内毒素是否可直接诱导胰岛细胞凋亡或者诱导胰岛细胞损伤的环节未见有报道。本研究通过单细胞凝胶电泳和 DNA 凝胶电泳分析SNP(外源 NO 供体)和 LPS 在离体条件下对胰岛细胞 DNA 损伤的作用,及其对高糖刺激β-细胞胰岛素合成与分泌的影响,以探讨 LPS 在胰岛细胞凋亡和胰岛素分泌功能障碍的可能作用。结果显示,外源 NO 可直接引起胰岛β-细胞 DNA 断裂,出现慧星尾巴和凋亡梯状带。NO 对胰岛细胞 DNA 损伤呈剂量依赖关系,低浓度NO(20~40 mmol/L, SNP)引起 DNA 有规律断裂,引起细胞凋亡;高浓度 NO(60 mmol/L SNP)可引起DNA 随机降解,引起细胞死亡。而 LPS 在离体条件下,对胰岛细胞损伤作用不明显。同时外源 NO 明显抑制葡萄糖刺激胰岛β-细胞合成和分泌胰岛素。同样离体条件下 LPS 对上述胰岛功能的影响不明显。结合我们前期研究[2]提示,LPS 通过整体作用,诱导炎症细胞和非炎症细胞 iNOS 表达,产生 NO 为介质对胰岛细胞产生损害作用。在此信号转导过程中,核因子NF-κB 与致炎细胞因子之间形成一种正反馈的联级放大,介导LPS 诱导胰岛细胞损伤[6]。而且由NO 生成的过氧化硝基化合物($ONOO^-$)是LPS 致胰岛细胞DNA 断裂和细胞凋亡(死亡)重要的诱导物和主要的化学介质[7,8]。随着内毒素持续诱导致炎细胞因子和 NO 的产生,选择性对胰岛β-细胞的损害,最终导致β-细胞功能紊乱和免疫功能下降,引起胰岛素合成与分泌衰竭。

参考文献:

[1] Arnush M, Scarim A L, Heitmeier M R. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes[J]. J Immunol, 1998, 160(6): 2 684—2 691.

[2] 李　强, 许霖水. NO 对内毒素血症大鼠胰岛细胞的作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 42—44.

[3] Kwon G, Corbett J A, Rodi C P, *et al*. IL-1β-induced nitric oxide synthase expression by rat pancreatic β-cells: evidence for the involvement of NF-κB in the signaling mechanism[J]. Endocrinol, 1995, 136(6): 4 790—4 795.

[4] Mauricio D, Poulsen T M. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM. A question of life and death[J]. Diabetes, 1998, 47(10): 1 537—1 543.

[5] Barnes P J, Karin M. Nuclear factor-κB: a pivotal transciption factor in chronic inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1997, 336(15): 1 066—1 071.

[6] Delaney C A, Tyrbery B, Bouwens L, *et al*. Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death[J]. FEBS lett, 1996, 394(3): 300—306.

[7] Stassi G, Maria R D, Trucco G, *et al*. Nitric oxide primes pancreatic β-cell for fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. J Exp Med, 1997, 186(8): 1 193—1 200.

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net